

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra buněčné biologie



Diplomová práce

studijního oboru Buněčná a vývojová biologie, zaměření Fyziologie buňky

Mitochondriální cytochrom *c* oxidasa: inhibice kyanidem a vliv defektu asemblačního faktoru Surf1

Mitochondrial cytochrome *c* oxidase: cyanide inhibition and role of
assembly factor Surf1 defect

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Zdeněk Drahota, DrSc.

Praha 2010

Hana Nůsková

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Zdeňka Drahoty, DrSc., a všechny použité prameny řádně citovala.

Praha 3. 5. 2010

Hana Nůsková

Poděkování

Na tomto místě se sluší vyjádřit vděk všem, kteří nějakým způsobem, ať už materiálně, radou či psychickou podporou, přispěli ke zdárnému dokončení předkládané práce. A přesně to bych ráda učinila – děkuji Vám všem!

V první řadě děkuji MUDr. Josefu Houšťkovi, DrSc., vedoucímu Oddělení bioenergetiky FgÚ AV ČR, který mi nejenže poskytl zázemí a materiálně a finančně podporoval vznik mé diplomové práce, ale rovněž často přispěl cennou radou. Dále by následoval dlouhý výčet všech, kteří mě zasvětili do chodu laboratorního života, předávali mi své zkušenosti a naučili mě nepřeborný počet metod a postupů. Rozhovory s nimi podněcovaly mou fantazii k vytváření geniálních nápadů, které, jak se však později ukázalo, vedly často jen do slepé uličky. Naštěstí nade mnou bděl můj školitel RNDr. Zdeněk Drahota, DrSc., který brzdil mé nadšení z nesmyslů a vedl mě tím správným směrem. Víím, že to se mnou neměl vždy lehké a musel projevit notnou dávku trpělivosti, protože pro mě více než pro koho jiného platí, že chybami se člověk učí, a proto má můj obdiv a úctu, že to v plném duševním zdraví vydržel až do této chvíle.

Nakonec bych nerada opomněla své rodiče, kteří zpočátku jen skepticky pokyvovali hlavami nad mým výběrem vysoké školy, protože přece existují mnohem perspektivnější obory a výdělečnější zaměstnání než vědecký pracovník, přesto na mé studium mlčky přispívali nemálo, za což jsem jim nesmírně vděčná. Později dospěli k jakési nechápavé rezignaci a dnes snad už i chápou, že věda má smysl a baví mě. Věda totiž žije!

Práce byla vypracována na Oddělení bioenergetiky FgÚ AV ČR, v.v.i. (vedoucí MUDr. Josef Houšťek, DrSc.) a finančně a materiálně zajištěna granty 303/07/0781 (GA ČR) a AV0Z 50110509 a 1M0520 (GA MŠMT ČR).

Abstrakt

Aktivita mitochondriální cytochrom *c* oxidasy (COX, EC 1.9.3.1) může být ovlivněna jak faktory exogenními, tak endogenními. Nejúčinnější a v prostředí se nejhojněji vyskytující látkou, jež inhibuje COX, je kyanid. Velmi častá příčina lidské deficiencie COX je představována defektem v genu *SURF1*.

Mechanismus inhibičního účinku kyanidu na COX stejně jako podmínky jeho zvratu nejsou zcela vysvětleny. Tři parametry funkce COX, jmenovitě transport elektronů (spotřeba kyslíku), transport protonů (mitochondriální membránový potenciál, $\Delta\psi_m$) a afinita ke kyslíku (hodnota p_{50}), byly studovány s ohledem na inhibici KCN a její zvrát pyruvátem. Analyzována byla funkce COX v intaktních izolovaných mitochondriích jak v rámci dýchacího řetězce, tak jako samostatný enzym za použití sukcinátu nebo arteficielního elektronového donoru askorbát + TMPD. 250 μ M KCN zcela inhiboval elektron- i protontransportní funkci COX a tato inhibice byla plně reverzibilní, což se projevilo plnou aktivitou po promytí mitochondrií. Přidání 60 mM pyruvátu vyvolalo maximální obnovu obou parametrů pouze na 60 – 80 % původních hodnot. KCN o nízkých koncentracích do 5 μ M způsobil výrazný, třicetinásobný pokles afinity COX ke kyslíku. Tento pokles byl opět plně reverzibilní promytím mitochondrií, zatímco podání pyruvátu vedlo jen k částečné, přesto signifikantní obnově afinity ke kyslíku. Tyto výsledky ukazují reverzibilní podstatu inhibice COX kyanidem a odhalují omezený potenciál pyruvátu působit jako kyanidové antidotum. Rovněž vyplývá, že afinita COX ke kyslíku je nejcitlivějším ukazatelem pro detekci toxického efektu kyanidu.

Funkce proteinu Surf1, asemblačního faktoru COX, je stále diskutována. Vliv defektu Surf1 na všechny tři funkční parametry COX byl analyzován v kultivovaných imortalizovaných fibroblastech získaných z myši s knockoutem v genu *SURF1*. V *SURF1*^{-/-} fibroblastech byl obsah COX snížen na 58 % kontroly, a korespondoval tak s 38% poklesem aktivity COX, jež byla měřena spektrofotometricky a normalizována na aktivitu citrát synthasy. V rychlosti endogenní respirace ani respirace s askorbátem a TMPD permeabilizovaných buněk však nebyla pozorována žádná změna. $\Delta\psi_m$ generovaný COX dosáhl 92 % maximálního $\Delta\psi_m$ v kontrolních buňkách, ale pouze 73 % v *SURF1*^{-/-} buňkách. Proton-translokační funkce COX tedy byla částečně snížena. Jelikož hodnota p_{50} u *SURF1*^{-/-} buněk byla alespoň dvakrát zvýšena oproti kontrole ve všech měřených metabolických

stavech, afinita ke kyslíku se opět ukázala jako nejcitlivější a nejvíce ovlivněný funkční parametr COX. Ve srovnání s buňkami *Surf1*-deficientních pacientů vykazovaly myši *SURF1*^{-/-} buňky mnohem mírnější funkční projevy poškození COX, což svědčí o tom, že assembly faktor *Surf1* není u myši tolik esenciální jako u člověka.

Klíčová slova

Mitochondrie, dýchací řetězec, cytochrom *c* oxidasa, inhibice kyanidem, antidota, *SURF1* defekt.

Abstract

The activity of mitochondrial cytochrome *c* oxidase (COX) can be affected by either exogenous or endogenous factors. The most efficient and in the environment abundant compound that inhibits COX is cyanide. The very frequent cause of COX deficiency in humans is represented by a defect in the *SURF1* gene.

The mechanism of cyanide inhibitory effect on COX as well as the conditions for its recovery are not yet fully explained. Three parameters of COX function, namely the transport of electrons (oxygen consumption), the transport of protons (mitochondrial membrane potential, $\Delta\psi_m$) and the enzyme affinity to oxygen (p_{50} value), were studied with regard to the inhibition by KCN and its reversal by pyruvate. The function of COX was analysed in intact isolated rat liver mitochondria, both within the respiratory chain and as a sole enzyme, using succinate or an artificial electron donor ascorbate + TMPD as a substrate. 250 μ M KCN completely inhibited both electron- and proton-transporting function of COX, and this inhibition was reversible as proved with washing of mitochondria. The addition of 60 mM pyruvate induced the maximal recovery of both parameters to 60 – 80 % of original values. Using KCN in the low concentration range up to 5 μ M, a profound, 30-fold decrease of COX affinity to oxygen was observed. Again, this decrease was completely reversed by washing of the mitochondria while pyruvate induced only a partial yet still significant recovery of oxygen affinity. These results demonstrate the reversible nature of inhibition of COX by cyanide and reveal the limited potential of pyruvate to act as a cyanide poisoning antidote. Importantly, it is also shown that the COX affinity to oxygen is the most sensitive indicator for the detection of toxic effect of cyanide.

The function of Surf1 protein, an assembly factor of COX, remains unclear. The influence of Surf1 defect on all three functional parameters of COX was analysed in cultivated immortalised fibroblasts originated from the *SURF1* knock-out mice. The COX content was decreased to 58 % of the control in correspondence to 38% decrease of COX activity measured spectrophotometrically and normalised to the citrate synthase activity. However, further experiments revealed that there was no change in the rate of endogenous respiration as well as in the rate of ascorbate+TMPD-dependent respiration of permeabilised cells. $\Delta\psi_m$ generated by COX achieved 92 % of maximal $\Delta\psi_m$ in the control cells, but only 73 % in the *SURF1*^{-/-} cells. Therefore, the proton-pumping activity of COX was partially

impaired. Since the p_{50} value of *SURF1*^{-/-} cells was approximately 2-fold increased in all metabolic states measured, the oxygen affinity was again identified as the most sensitive and the most affected functional parameter of COX. The *SURF1*^{-/-} cells showed milder functional manifestations of COX impairment than the cells of Surf1-deficient patients, which indicates that the Surf1 protein is not as essential for mouse as for human.

Key Words

Mitochondria, respiratory chain, cytochrome *c* oxidase, cyanide poisoning, antidotes, Surf1 defect.

Obsah

PODĚKOVÁNÍ	2
ABSTRAKT	3
ABSTRACT	5
OBSAH	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 ÚVOD	11
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1 Mitochondrie	13
2.2 Dýchací řetězec	15
2.3 Cytochrom <i>c</i> oxidasa	16
2.3.1 Struktura cytochrom <i>c</i> oxidasy	16
2.3.2 Funkční parametry cytochrom <i>c</i> oxidasy	18
2.3.2.1 Transport elektronů	18
2.3.2.2 Transport a translokace protonů	20
2.3.2.3 Afinita ke kyslíku – koncept p_{50}	22
2.4 Biogeneze cytochrom <i>c</i> oxidasy	23
2.4.1 Asemblace cytochrom <i>c</i> oxidasy	24
2.4.2 Asemblační faktor Surf1	25
2.5 Inhibice cytochrom <i>c</i> oxidasy	26
2.5.1 Rezervní kapacita cytochrom <i>c</i> oxidasy	26
2.5.2 Inhibitory cytochrom <i>c</i> oxidasy	27
2.5.3 Inhibice cytochrom <i>c</i> oxidasy kyanidem	28
2.5.3.1 Mechanismus inhibice COX kyanidem	28
2.5.3.2 Kyanidová antidota založená na endogenních mechanismech detoxifikace organismu	28
2.5.3.3 Protektivní účinky 2-oxokyselin proti kyanidové toxicitě	29
3 MATERIÁL A METODY	32
3.1 Seznam použitých chemikálií	32
3.2 Izolace mitochondrií z jater potkana	33
3.3 Tkáňové kultury	33
3.4 Stanovení koncentrace proteinu metodou dle Bradfordové	35

3.5	Měření respirace	35
3.6	Výpočet p_{50}	37
3.7	Měření membránového potenciálu	40
3.8	SDS elektroforéza a Western Blot	43
3.8.1	Příprava vzorků na SDS elektroforézu	43
3.8.2	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza	43
3.8.3	Elektrotransfer na PVDF membránu	44
3.8.4	Imunodetekce na PVDF membráně	45
3.8.5	Opakované použití PVDF membrány	47
3.9	Stanovení koncentrace volného KCN v inkubačním médiu	47
3.10	Spektrofotometrické měření enzymových aktivit	49
3.10.1	Cytochrom <i>c</i> oxidasa	49
3.10.1.1	Příprava redukovaného cytochromu <i>c</i>	49
3.10.2	Citrát synthasa	50
3.10.3	Sukcinát:cytochrom <i>c</i> oxidoreduktasa	50
3.10	Statistika	51
4	VÝSLEDKY	52
4.1	Cytochrom <i>c</i> oxidasa: inhibice kyanidem a pyruvátem indukovaná obnova aktivity	52
4.1.1	Vliv kyanidu na elektrontransportní funkci COX	53
4.1.1.1	Inhibice respirace	53
4.1.1.2	Reverzibilita inhibice respirace	55
4.1.1.3	Obnova respirace pyruvátem	55
4.1.2	Vliv kyanidu na protontransportní funkci COX	57
4.1.2.1	Pokles membránového potenciálu	57
4.1.2.2	Reverzibilita efektu kyanidu na membránový potenciál	58
4.1.2.3	Obnova membránového potenciálu pyruvátem	58
4.1.3	Vliv kyanidu na afinitu ke kyslíku	58
4.1.3.1	Snížení afinity ke kyslíku	58
4.1.3.2	Reverzibilita působení kyanidu na afinitu ke kyslíku	60
4.1.3.3	Obnova afinity ke kyslíku pyruvátem	60
4.1.4	Citlivost COX ke kyanidu	61
4.1.5	Stanovení koncentrace volného kyanidu v inkubačním médiu	62
4.2	Cytochrom <i>c</i> oxidasa: defekt asemblačního faktoru Surf1	63
4.2.1	Snížený obsah a aktivita cytochrom <i>c</i> oxidasy	64
4.2.2	Vliv defektu Surf1 na rychlost respirace	66
4.2.3	Vliv defektu Surf1 na membránový potenciál	66
4.2.4	Vliv defektu Surf1 na afinitu ke kyslíku	68
5	DISKUZE	69
6	SHRNUTÍ	75
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76

Seznam použitých zkratek

ADP	adenosindifosfát
AP	peroxodisíran amonný („ammonium peroxodisulphate“)
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin („bovine serum albumine“)
CoI – CoV	označení komplexů dýchacího řetězce, CoI – NADH dehydrogenasa, CoII – sukcinát dehydrogenasa, CoIII – komplex cytochromů bc ₁ , CoIV – cytochrom <i>c</i> oxidasa, CoV – ATP synthasa
CoA	koenzym A
COX	cytochrom <i>c</i> oxidasa
ctrl	kontrolní vzorek („control“)
cyt	cytochrom
Da	dalton (g/mol)
DMEM	kultivační médium pro buněčné kultury („Dulbecco's modified Eagle medium“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPH	dioktylfthalát („dioctylphthalate“)
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
ECL kit	chemiluminiscenční kit („enhanced chemiluminiscent kit“)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAD/ FADH ₂	flavinadenindinukleotid (oxidovaná/redukovaná forma)
FBS	fetální hovězí sérum („fetal bovine serum“)
FCCP	karbonylkyanid- <i>p</i> -trifluoromethoxyfenylhydrazon
g	tíhové zrychlení
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonová kyselina
KP _i	10 mM K-fosfátový pufr (pH 7,4)
LD ₅₀	dávka, která je smrtelná pro 50 % experimentálních zvířat („lethal dose“)
LM	laurylmaltosid (n-dodecyl β-D-maltosid)
NAD ⁺ /NADH	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná/redukovaná forma)
<i>p</i> ₅₀	parciální tlak kyslíku, při kterém je rychlost enzymatické reakce cytochrom <i>c</i> oxidasy rovna 50 % maxima (analogie Michaelisovy konstanty K _M)

PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza („polyacrylamide gel electrophoresis“)
PBS	fyzilogický roztok pufovaný fosfátem
PS	polystyren
pTPP	přirozený logaritmus koncentrace TPP ⁺ (μM), vyjádření velikosti mitochondriálního membránového potenciálu
PVC	polyvinylchlorid
PVDF	polyvinylidenfluorid
RLM	mitochondrie izolované z jater potkana („rat liver mitochondria“)
rpm	počet otáček za minutu („revolutions per minute“)
SDS	dodecylsulfát sodný („sodium dodecyl sulfate“)
<i>SURF1</i> ^{-/-}	nefunkční alela <i>SURF1</i> genu v homozygotním stavu
TBS	fyzilogický roztok pufovaný Tris
TBST	fyzilogický roztok pufovaný Tris (TBS) s 0,1% (v/v) detergentem Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
THF	tetrahydrofuran
TMPD	N,N,N',N'-tetramethylfenylendiamin
TPP ⁺	tetrafenylfosfoniový kation (tetrafenylfosfonium)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
v/v	objemová procenta
w/v	hmotnostní procenta

1 Úvod

Z hlediska buněčné energetiky patří dýchací řetězec lokalizovaný na vnitřní mitochondriální membráně mezi nejdůležitější metabolické dráhy v eukaryotní buňce. Dalo by se říci, že je dokonce dráhou esenciální, jelikož na základě jeho činnosti je produkována většina ATP, univerzálního zdroje energie. Nepostradatelnou součástí dýchacího řetězce je cytochrom *c* oxidasa (COX), která katalyzuje jeho poslední krok. Mutace v podjednotkách COX i v jaderně kódovaných specifických asemblačních faktorech, jako je Surf1, bývají příčinou mitochondriálních dědičných poruch, jež se často manifestují jako Leighův syndrom.

Z důležitosti dýchacího řetězce pro buňku plyne, že jakkoli způsobená nefunkčnost COX, ať už mutací v podjednotce či asemblačním faktoru, nebo inhibicí specifickou molekulou, má pro aerobní organismy fatální důsledky. Nejvýznamnějším inhibitorem COX je kyanid, jako jed používaný traviči a sebevrahy již v době antiky. O vlastním mechanismu inhibice je toho poměrně hodně známo, ale stále zůstává řada nejasností. Jedním z mých cílů proto bylo porovnat citlivost ke kyanidu (KCN) u tří různých funkčních parametrů COX – jedná se o transport elektronů měřený jako spotřeba kyslíku, pumpování protonů projevující se vznikem membránového potenciálu a afinitu ke kyslíku, jejíž hodnocení umožnilo ve větší míře až vyvinutí respirometru s vysokým rozlišením (oxygrafu).

Dnes k setkání s kyanidem může dojít zejména při haváriích v průmyslu, kde je hojně využíván k výrobě polymerních látek, a následně při požárech domů, kdy je spalováním těchto látek naopak plynný kyanovodík uvolňován. Proto jsou lidé při požárech často přiotráveni kyanidem. Obava z kyanidu v rukách teroristů, kterou s sebou nese dnešní nejistá doba, patří však spíše do oblasti vědeckofantastické literatury. Nicméně i to je jedna z příčin, proč se znovu po mnoha letech debatuje o špatné účinnosti a o úskalích použití kyanidových antidot a proč se hledají nová, účinnější, bezpečnější. Inhibice COX kyanidem je plně reverzibilní, což lze snadno demonstrovat promytím mitochondrií inkubovaných s kyanidem. Mě však zajímalo, jak si při obnově aktivity COX povede pyruvát. 2-Oxokyseliny (či postaru α -ketokyseliny) totiž s kyanidy reagují za vzniku netoxického kyanohydrinu, 2-oxoglutarát (α -ketoglutarát) byl dokonce již zkoumán jako antidotum v experimentech na zvířatech. Vzhledem k přítomnosti pyruvátového přenašeče ve vnitřní mitochondriální membráně by ale pyruvát mohl mít lepší přístup do mitochondrií, a proto

být účinnějším antidotem než 2-oxoglutarát. Získané výsledky by mohly v hrubých obrysech napovědět o vhodnosti či nevhodnosti pyruvátu pro humánní medicínu.

Kyanid představuje exogenní faktor ovlivňující aktivitu COX. Alespoň zjednodušeně jsem chtěla porovnat jeho účinek s nefunkčností COX vyvolanou faktorem endogenním, a to defektem asemblačního faktoru Surf1. Jedná se přitom o porovnání velmi vzdálené, jelikož k hodnocení kyanidové inhibice jsem jako model používala izolované mitochondrie z jater potkana a ke studiu defektu Surf1 jsem měla k dispozici buněčnou linii imortalizovaných myších fibroblastů. Již samotná charakterizace *SURF1*^{-/-} myších fibroblastů může vypovědět více o změnách COX vlivem defektu proteinu Surf1 než charakterizace buněk pacientů, jež byla dříve provedena. U tohoto modelu totiž nacházíme stejné genetické pozadí jako u kontrolních buněk, a tedy všechny rozdíly mezi kontrolními a *SURF1*^{-/-} buňkami můžeme plně přisoudit rozdílu ve funkčnosti proteinu Surf1. Toho při vzájemném porovnání buněk pacientů a zdravých jedinců dosáhnout nemůžeme.

Cíle diplomové práce

- Studovat vliv kyanidové inhibice na jednotlivé funkční parametry COX
- Ukázat reverzibilitu inhibice COX kyanidem a vyšetřit schopnost pyruvátu obnovit aktivitu inhibované COX
- Studovat vliv defektu asemblačního faktoru Surf1 na jednotlivé funkční parametry COX a výsledky porovnat jednak s účinkem kyanidu, jednak s funkčními projevy Surf1-deficientních buněk pacientů dle publikovaných údajů

2 Literární přehled

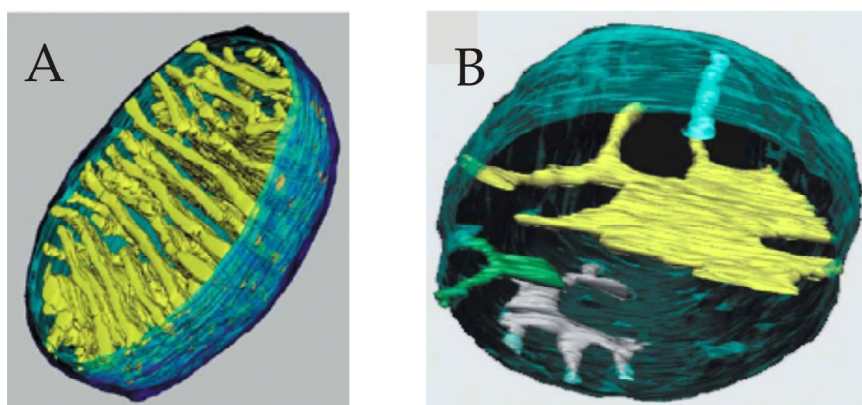
2.1 Mitochondrie

Život všech buněk, potažmo mnohobuněčných organismů je energeticky zajištěn metabolickou přeměnou přijatých substrátů. Přitom platí, že za anaerobních podmínek získá buňka z jedné molekuly glukosy prostřednictvím glykolýzy, odehrávající se v cytoplasmě, pouhé 2 molekuly ATP, univerzálního zdroje energie pro všechny buněčné procesy, zatímco pokud buňka dokáže v dalších krocích využít kyslík, může to být přibližně 15krát více v procesu zvaném oxidační fosforylace. Ta se v eukaryotní buňce odehrává ve speciální organelle – mitochondrii, kde je oxidace glukosy dovedena až k CO_2 a H_2O . Mitochondrie je tak hlavním producentem ATP, což z ní činí jakousi „buněčnou elektrárnu“.

Původ mitochondrií vysvětluje tzv. endosymbiotická teorie vzniku organel. Podle ní jsou mitochondrie eukaryotních buněk přímými potomky eubakteriálního endosymbionta, který byl původně endocytován protoeukaryotní hostitelskou buňkou s anaerobním heterotrofním typem metabolismu. Analýza mitochondriálních genových sekvencí podporuje monofyletický původ mitochondrií, což znamená, že mitochondrie jako organela v evoluci vznikly pouze jednou, a to již ve společném předkovi všech v současnosti existujících eukaryotních organismů. Za nejbližší příbuzné mitochondrií je považována rickettsiální podskupina α -proteobakterií, což jsou obligátní intracelulární parazité (1).

Jako typický bakteriální genom je i ten mitochondriální tvořen většinou cyklickou molekulou DNA o velikosti 6 až 200 kbp. Následkem endosymbiotického způsobu života mají mitochondrie ve srovnání s příbuznými mikroorganismy genom značně redukováný. Během vývoje totiž došlo k přesunu většiny původně bakteriálních genů do jádra a mitochondrie se stala semiautonomní organelou, plně závislou na jaderných genech. Pro správné proteinové složení a funkci mitochondrií je tedy nutná koordinovaná součinnost jaderného a vlastního mitochondriálního genomu. V principu platí, že čím evolučně pokročilejší organismus, tím méně genů zůstalo zachováno v mitochondriálním genomu. Lidská mitochondriální DNA umožňuje expresi již jen 13 proteinů, vesměs podjednotek komplexů dýchacího řetězce a ATP synthasy, a zároveň kóduje sadu 22 tRNA, jež plně dostačuje k překladu všech kodonů vlastním translačním aparátem.

Mitochondrie jsou obvykle zobrazovány jako izolované protáhlé cylindrické útvary v cytoplasmě buňky o průměru 0,5 – 1 μm , ale často tvoří dynamické síťovité struktury. Struktura samotné mitochondrie je rovněž značně ovlivněna jejím endosymbiotickým původem. Vnější membrána, původně obal endosomu, tedy odvozená od plasmatické membrány hostitelské buňky, a vnitřní membrána, původem plasmatická membrána eubakteriálního endosymbionta, vymezují dva vnitřní kompartmenty – mezimembránový prostor mezi nimi a matrix ohraničenou vnitřní membránou. Dle obrázků pořízených elektronovou tomografií se vnitřní mitochondriální membrána skládá ze dvou komponent – jedna kopíruje vnější membránu a lze ji označit jako vnitřní hraniční membrána („inner boundary membrane“), zbývající část tvoří kristy, výběžky do matrix (Obr. 2.1). Mezi kristami a vnitřní hraniční membránou se nacházejí tubulární spoje („cristae junctions“) o průměru přibližně 28 nm. Kristy výrazně zvětšují povrch vnitřní membrány, kde jsou lokalizovány komplexy dýchacího řetězce a ATP synthasy. Existují experimentální důkazy, které prokazují, že o cytochrom c oxidasu je obohacena především membrána krist, dokládají tedy i funkční kompartmentalizaci vnitřní membrány, která je zřejmě udržována prostřednictvím regulace „cristae junctions“ (2).



Obr. 2.1 Trojrozměrný model mitochondrie vytvořený na základě metody elektronová tomografie (2).

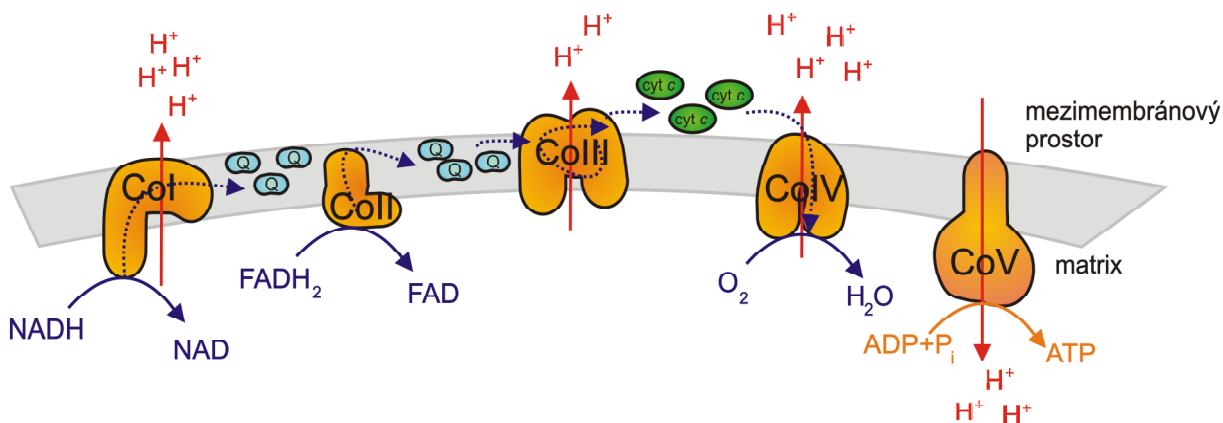
(A) Vnější membrána průsvitně tmavě modrá, vnitřní hraniční membrána průsvitně světle modrá, membrána krist žlutá. (B) Zobrazené pouze 4 kristy, každá označena jinou barvou. Pozorovány různé morfologické tvary krist, z nichž žlutá je nejtypičtější jako příklad lamelárního kompartmentu s mnohočetnými „cristae junctions“ propojujícími kristu s vnitřní hraniční membránou.

2.2 Dýchací řetězec

Elektrony uvolněné při oxidaci substrátů jsou uloženy ve formě redukovaných koenzymů NADH a FADH₂. Čtyři enzymové komplexy dýchacího řetězce (NADH dehydrogenasa, NADH:koenzym Q oxidoreduktasa, CoI; sukcinát dehydrogenasa, sukcinát:koenzym Q oxidoreduktasa, CoII; komplex cytochromů bc₁, koenzym Q:cytochrom c oxidoreduktasa, CoIII; cytochrom c oxidasa, cytochrom c:O₂ oxidoreduktasa, CoIV) lokalizované na vnitřní mitochondriální membráně transportují za spoluúčasti mobilních elektronových přenašečů ubichinolu (koenzymu Q) a cytochromu c (cyt c) elektrony z NADH a FADH₂ postupně až na molekulární kyslík (Obr. 2.2).

Komplexy dýchacího řetězce asociují v tzv. superkomplexy dýchacího řetězce (respirasomy), jež byly objeveny jak v bakteriální plasmatické membráně, tak ve vnitřní mitochondriální membráně. Existence superkomplexů zvyšuje efektivitu dýchacího řetězce, jelikož jsou výrazně redukovány vzdálenosti, které substráty, tj. koenzym Q a cyt c, musí překonat difúzí mezi jednotlivými enzymovými komplexy („substrate channeling“) (3).

Přenos elektronů na komplexech dýchacího řetězce probíhá ve směru zvyšujícího se redoxního potenciálu, přičemž se uvolňuje přebytečná energie. Ta je transformována do



Obr. 2.2 Schéma dýchacího řetězce.

Elektrony do dýchacího řetězce vstupují z redukovaných koenzymů NADH a FADH₂, přičemž jsou prostřednictvím NADH dehydrogenasy (CoI) a sukcinát dehydrogenasy (CoII) přeneseny na koenzym Q. Ten je předává na komplex cytochromů bc₁ (CoIII), kde procházejí tzv. Q-cyklem, a následně jsou cytochromem c transportovány na cytochrom c oxidasu (CoIV). Transport elektronů dýchacím řetězcem je spřažen s pumpováním protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Výsledný elektrochemický gradient protonů je využit ATP syntasou (CoV) jako zdroj energie k produkci ATP. Upraveno dle Voet et Voet (4).

podoby elektrochemického protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně prostřednictvím pumpování protonů z mitochondriální matrix třemi enzymovými komplexy dýchacího řetězce, a to CoI, CoIII a CoIV. Tento gradient protonů má jednak složku chemickou, jež odpovídá vyšší koncentraci protonů v mezimembránovém prostoru ve srovnání s matrix (ΔpH), a jednak složku elektrickou, potenciálovou, jelikož kumulace kladného náboje protonů v mezimembránovém prostoru má za následek, že matrix se vůči mezimembránovému prostoru stává elektricky negativní ($\Delta\psi_m$). Tento elektrochemický gradient ($\Delta\mu_{H^+}$), jehož existence je podmíněna neprostupností membrány pro ionty, je následně využit F_1F_0 -ATP synthasou, rovněž membránově vázanou a často označovanou jako komplex V dýchacího řetězce, k produkci ATP z ADP a anorganického fosfátu (5). Komplexy dýchacího řetězce společně s ATP synthasou tak dohromady tvoří tzv. systém oxidační fosforylace (OXPHOS). Mimo syntézu ATP může být dále energie uložená v $\Delta\mu_{H^+}$ použita k disipaci tepla rozpřahujícími („uncoupling“) proteiny či k transportu iontů, metabolitů a makromolekul přes vnitřní mitochondriální membránu (6).

2.3 Cytochrom *c* oxidasa

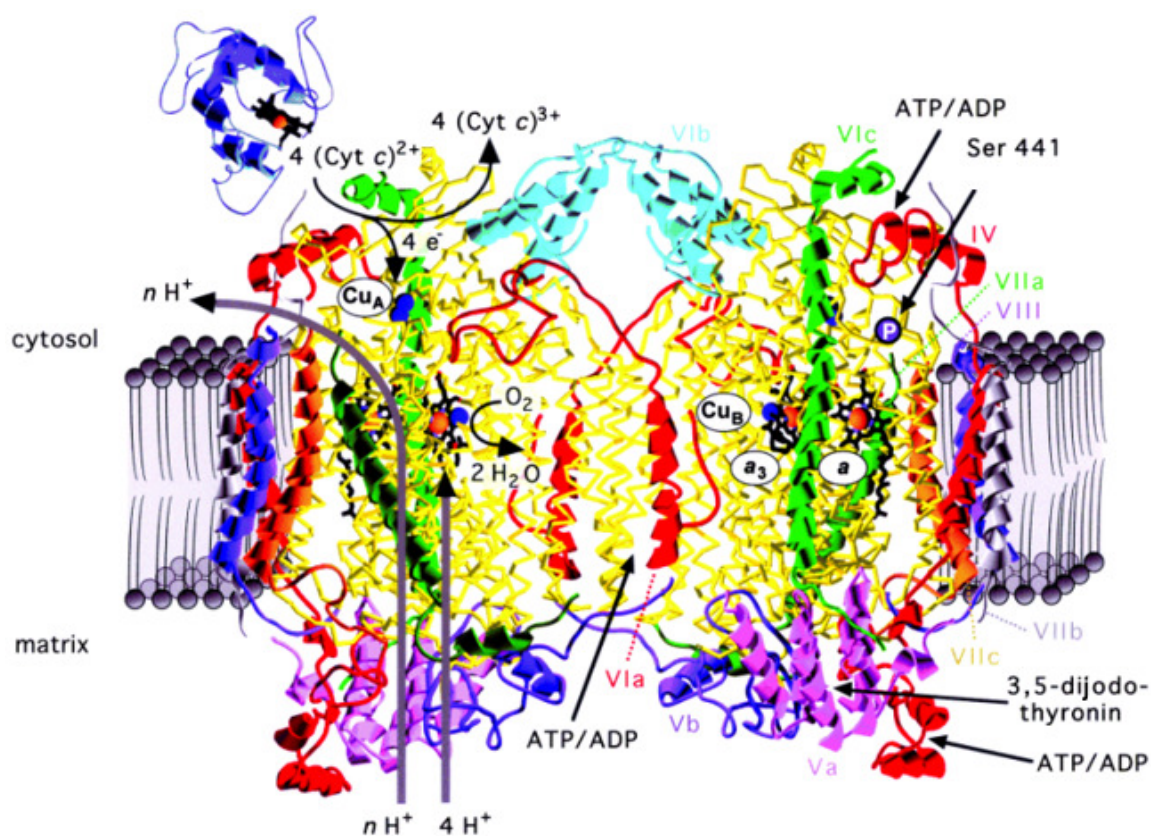
2.3.1 Struktura cytochrom *c* oxidasy

Cytochrom *c* oxidasa (COX, EC 1.9.3.1) náleží k superrodině terminálních oxidas fungujících jako protonové pumpy poháněné redoxním potenciálem, které redukci molekulárního kyslíku na vodu spřahují s translokací protonů přes membránu (7). Pro všechny členy této rodiny je charakteristická vysoká sekvenční homologie největší podjednotky Cox1 a přítomnost binukleárního aktivního centra sestávajícího z vysokospinového hemu a_3 a blízce asociovaného kationtu Cu_B (8).

Savčí COX (Obr. 2.3) má molekulovou hmotnost přibližně 200 kDa a skládá se celkem ze 13 podjednotek, z nichž 3 největší jsou kódované mitochondriálním genomem (Cox1 – Cox3) a tvoří evolučně konzervované katalytické jádro zahrnující 4 redoxní centra (Cu_A , hem a , hem a_3 a Cu_B). Jejich biosyntéza probíhá kompletně v mitochondriích a účastní se jí mitochondriální proteosyntetický aparát. Zbývajících 10 menších podjednotek je kódováno v buněčném jádře, syntetizováno v cytosolu a následně importováno do mitochondrií. Jaderně kódované podjednotky plní funkce asemblační a regulační, tj. účastní se skládání podjednotek ve funkční enzymový komplex a podílejí se na regulaci jeho aktivity (9, 10).

Navzdory intenzivnímu zkoumání však zůstává přesná funkce většiny jaderně kódovaných podjednotek COX zahalena tajemstvím. Regulace aktivity COX je zprostředkována alosterickou vazbou ADP/ATP, 3,5-dijodothyroninu či fosforylací (11).

Aminokyselinová sekvence a struktura tří podjednotek katalytického jádra je vysoce konzervovaná a značně se podobá bakteriálnímu enzymu, nárůst počtu jaderně kódovaných podjednotek v evoluci eukaryotního enzymu má však význam pro rozšíření škály možností regulace vlastní katalytické činnosti komplexu – u bakterie *Paracoccus denitrificans*, jež slouží jako model prokaryotního enzymu, je pouze jedna regulační podjednotka, zato v savcích buňkách, kde je jako modelový používán enzym z hovězího srdce, je jich 10. Další zásadní



Obr. 2.3 Struktura dimeru COX z mitochondrií hovězího srdce (10).

Mitochondriálně kódované podjednotky Cox1 – Cox3 (zobrazené žlutě) obsahují postupně 12, 2 a 7 transmembránových helixů. Vazebné místo pro cyt c a centrum Cu_A jsou lokalizované na cytosolické straně Cox2, zatímco hem a a binukleární centrum hem a_3 – Cu_B vázající kyslík v hydrofobním vnitřku Cox1. 7 z 10 jaderně kódovaných podjednotek tvoří jediný transmembránový helix a 3 podjednotky se nacházejí vně membrány, z nichž 2 na matrixové (Cox5a a 5b) a 1 na cytosolické straně membrány (Cox6b). V monomeru nalevo je schematicky naznačena redoxní reakce katalyzovaná COX, v monomeru napravo jsou vyznačena vazebná místa pro různé alosterické regulátory COX – jedno vazebné místo pro 3,5-dijodothyronin, tři pro ADP/ATP a také cíl regulace fosforylací na Cox1 (Ser 441).

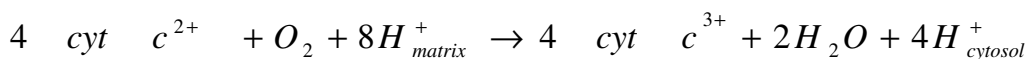
evoluční změnou je, že COX není v eukaryotní buňce funkční ve formě monomeru jako u *P. denitrificans*, ale pouze ve formě dimeru, i když se zdá, že dimerní stav izolovaného enzymu není esenciální pro jeho funkci *in vitro*. Kontakt monomerů zprostředkují podjednotky Cox6a a Cox6b (12).

Zatímco mitochondriálně kódované podjednotky jsou kódovány unikátními geny, některé z jaderně kódovaných podjednotek COX byly v genomu nalezeny v několika kopiích, proto mohou být exprimovány v tkáňově specifických isoformách (13). Stejně tak byla u savců prokázána i existence vývojově specifických isoform COX. Výskyt tkáňově a vývojově specifických izozymů COX savců a vliv jaderně kódovaných podjednotek na katalytickou funkci jsou podpořeny i fenotypickými projevy lidských mitochondriálních myopatií zapříčiněných defektní COX – např. u fatální dětské mitochondriální myopatie COX ve svaích nevykazuje žádnou aktivitu, zatímco v ostatních tkáních (v játrech, srdci a mozku) je plně aktivní (14).

Kromě 4 redoxních center esenciálních pro správnou katalytickou funkci COX jsou součástí enzymového komplexu ještě pevně vázaná neredoxní centra – u bakteriálního enzymu Mg^{2+} a Ca^{2+} , u eukaryotního Mg^{2+} , Na^{+} a Zn^{2+} . Jejich funkce však zatím zůstává neznámá (8).

2.3.2 Funkční parametry cytochrom *c* oxidasy

Katalytický cyklus COX spočívá v přenosu 4 elektronů dodaných redukováným cyt *c* na molekulární kyslík, přičemž jsou spotřebovány 4 protony z matrix na tvorbu dvou molekul vody (tzv. chemické protony). Elektrontransportní reakce, které se účastní 4 redoxní centra COX, je nepřímě spřažena s translokací dalších protonů z matrix do mezimembránového prostoru (tzv. pumpované protony) a může být schematicky zapsána (7, 15):

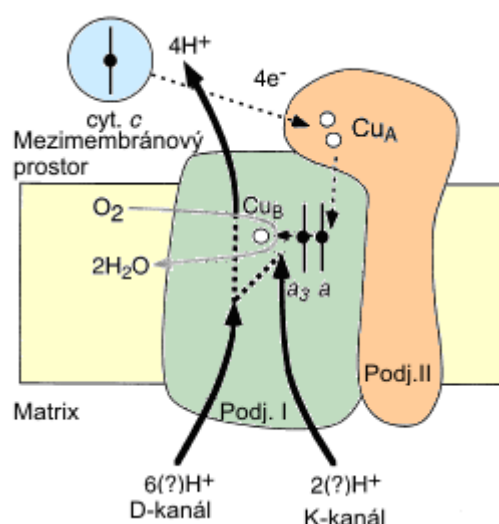


2.3.2.1 Transport elektronů

Vazba redukováného cyt *c* na COX je umožněna prostřednictvím elektrostatických interakcí mezi kladně nabitými ϵ -aminoskupinami sedmi až osmi vysoce konzervovaných

lysinů exponovaných na jeho povrchu a zřejmě stejným počtem záporně nabitých karboxylových skupin aspartátů a glutamátů v jeho vazebném místě, jež se nachází mezi monomery COX. Elektron odevzdaný cyt *c* vstoupí do komplexu COX přes konzervovaný tryptofan podjednotky Cox2. Akceptorem elektronu je redoxní centrum Cu_A , které tvoří dva elektronicky spárované kationty smíšené valence Cu^I/Cu^{II} a je lokalizované poblíž vazebného místa pro cyt *c*. Elektron je následně předán na hem *a* na podjednotce Cox1 (Obr. 2.4). Tento tzv. nízkospinový hem je blíže Cu_A centru nežli hem a_3 , proto je kineticky preferovaným akceptorem elektronu. Hem *a* v nízkospinovém stavu udržují dva axiální histidinové ligandy. Vysokospinový hem a_3 (axiální histidinový ligand) a elektronicky spárované centrum Cu_B (3 histidinové ligandy) tvoří binukleární centrum enzymu, zanořené přibližně do hloubky jedné třetiny membrány. Zde se na COX váže molekula O_2 a dochází k její redukci na vodu. (8).

Evoluční výhodou tohoto enzymového komplexu pro buňky je, že COX redukuje kyslík mechanismem, při němž nedochází k tvorbě a uvolnění kyslíkových radikálů, jež by mohly letálně poškodit buněčné struktury. Důvodem je téměř současný přenos všech 4 elektronů na kyslík, který se váže na plně redukované aktivní centrum, přičemž 2 elektrony pocházejí z cyt *c* a zbylé 2 jsou přechodně poskytnuty samotnou COX – atom železa hemu a_3 je formálně oxidován na Fe^{4+} a čtvrtý elektron dodá v těsné blízkosti binukleárního centra



Obr. 2.4 Schematické znázornění transferu elektronů mezi jednotlivými redoxními centry COX a translokace protonů z matrix do mezimembránového prostoru.

*Elektrony z cyt *c* vstupují do komplexu COX v redoxním centru Cu_A , odtud putují na hem *a* a poté konečně do binukleárního centra hem a_3 – Cu_B , kde redukují kyslík za vzniku dvou molekul vody. Upraveno dle Abramson et al. (8).*

lokalizovaný tyrosin, čímž se dočasně mění na tyrosinový radikál. Tato unikátní struktura katalytického centra umožňuje COX rozštěpit vazbu v molekule O_2 , i když je opožděn přísun dalších elektronů z cyt *c*, aniž by vznikaly radikály. Přenos elektronů na O_2 rovněž probíhá velmi rychle, jelikož jsou všechny v dané chvíli přítomny v aktivním centru enzymu (Tab. 2.1) (8, 10).

2.3.2.2 Transport a translokace protonů

Během redukce molekulárního kyslíku na vodu v jednom katalytickém cyklu jsou spotřebovány celkem 4 H^+ z matrix (tzv. chemické protony) a zároveň jsou další H^+ z matrix translokovány přes vnitřní mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru (tzv. pumpované protony). Obecně přijaté je stechiometrické vyčíslení translokace jednoho H^+ na jeden transportovaný elektron. Oba procesy svým způsobem přispívají ke zvyšování protonového elektrochemického gradientu na membráně (7, 10).

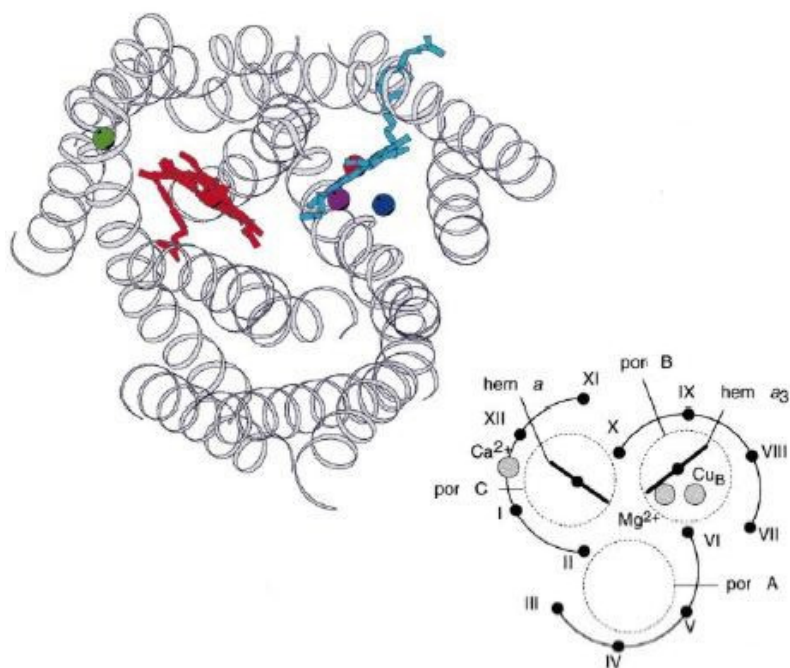
Intermediát COX	Redoxní a protonový stav binukleárního centra	Transport elektronů	Transport protonů
O_H	hem $a_3^{3+} OH^-$, $OH^- Cu_B^{2+}$, Tyr-OH	vstup 1. elektronu, transfer na Cu_B	vstup 2 H^+ , 1 pumpovaný
E_H	hem $a_3^{3+} H_2O$, $OH^- Cu_B^+$, Tyr-OH	vstup 2. elektronu do binukleárního centra	vstup 2 H^+ , 1 pumpovaný
R₂	hem $a_3^{2+} H_2O$, $H_2O Cu_B^+$, Tyr-OH	vazba kyslíku do redukovaného binukleárního centra, jeho redukce za vzniku tyrosinového radikálu	na redukci použity protony přítomné v binukleárním centru
P_M	hem $a_3^{4+} O^{2-}$, $OH^- Cu_B^{2+}$, Tyr-O \cdot	vstup 3. elektronu, zpětná redukce tyrosinu	vstup 2 H^+ , 1 pumpovaný
F	hem $a_3^{4+} O^{2-}$, $OH^- Cu_B^{2+}$, Tyr-OH	vstup 4. elektronu, zpětná redukce hemu a_3	vstup 2 H^+ , 1 pumpovaný

Tab. 2.1 Katalytický cyklus COX.

Ve zjednodušeném schématu upraveném dle Brzezinski et al. (7) jsou popsány jednotlivé kroky katalytického cyklu COX jednak z pohledu transportu jednotlivých elektronů při redukci kyslíku, jednak z pohledu transportu protonů využitých při této redukci i pumpovaných přes membránu do mezimembránového prostoru. Každý elektron, který vstoupí do binukleárního centra, je vždy doprovázen protonem, čímž je zachována elektroneutralita a nábojová rovnováha. Sekvence navazujících kroků končí intermediátem F, jehož přeměna přivádí cyklus opět na začátek.

Transport protonů u bakteriální COX probíhá přes hydrofobní jádro, a to konkrétně podjednotku Cox1, dvěma různými cestami. Cox1 se skládá ze 12 transmembránových helixů, jež jsou navzájem uspořádány tak, že vytváří 3 oblouky vykazující jakousi pseudotrojčetnou symetrii (Obr. 2.5). Každý oblouk je formován 4 transmembránovými helixy a spolu s posledním segmentem předchozího polokruhu tvoří pór. Tyto tři póry se liší ve své funkci – uvnitř póru B a C je lokalizováno binukleární centrum enzymu, resp. hem *a*, vnitřní poloviny těchto pórů slouží jako K-, resp. D-kanál pro translokaci protonů, vnější strana póru A je možnou přístupovou cestou kyslíku do binukleárního centra (8).

K-kanál umožňuje přímý vstup prvních dvou chemických protonů pórem B do binukleárního centra pro tvorbu vody (Obr. 2.4). Všechny ostatní protony jsou transportovány D-kanálem, jenž prochází pórem A hlouběji do Cox1 velkou polární dutinou vyplněnou asi 10 molekulami vody, které navzájem i s okolními polárními aminokyselinami vytvářejí síť vodíkových můstků, což umožňuje transportovat protony tímto kanálem prostřednictvím přeskoků mezi jednotlivými vodíkovými můstky (7). Za touto hydrofilní dutinou mezi hemy *a* a *a*₃ se nachází klíčový glutamát, jehož negativně nabitá postranní



Obr. 2.5 Struktura podjednotky Cox1 z *Paracoccus denitrificans* – pohled z vnější strany membrány.

Červeně hem *a*, modře hem *a*₃ (červené kolečko – kation Fe), modré kolečko – Cu_B, fialové kolečko – Mg²⁺, zelené kolečko – Ca²⁺. Převzato z Abramson et al. (8).

skupina by mohla fungovat jako usměrňovač protonů jednak do binukleárního centra k redukci kyslíku, a jednak napříč membránou do mezimembránového prostoru (8). Podle vysokého pK_a se zdá, že výše zmíněný glutamát je obvykle ve své protonované formě a protony poskytuje podle požadavku jejich akceptorů, načež jsou doplněny rychlou reptonací realizovanou přeskokem protonu v řetězci vodíkových můstků od aspartátu na povrchu enzymového komplexu (15).

U savčího enzymu byla definována ještě třetí protonová cesta, a to H-kanál, kterým procházejí všechny 4 pumpované protony. Funkce D- a K-kanálu je pak redukována na poskytování chemických protonů, přičemž každý z nich dodá do binukleárního centra dva. Jelikož tento kanál nebyl nalezen v prokaryotním enzymu, zůstává jeho existence kontroverzní (7).

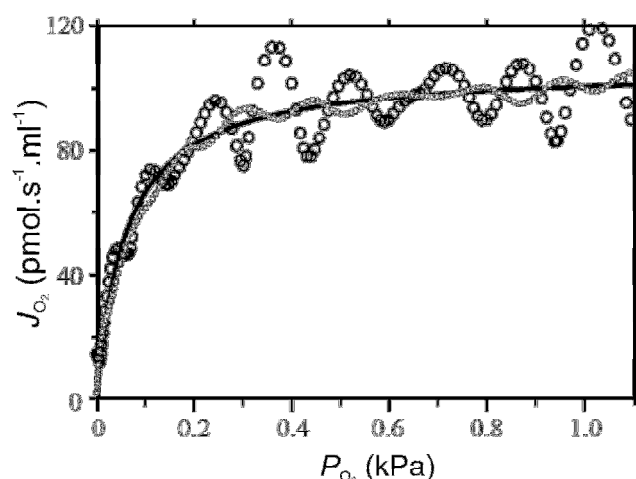
2.3.2.3 Afinita ke kyslíku – koncept p_{50}

Koncentrace kyslíku v mitochondriích je výsledkem dynamické rovnováhy mezi transportem kyslíku do tkání a spotřebou kyslíku dýchacím řetězcem. Parciální tlak kyslíku klesá o více než jeden řád během transportu k samotným mitochondriím, a to z 20 kPa ve vzduchu až na méně než 1 kPa uvnitř buněk (16). Izolované mitochondrie jsou tedy studovány při nefyziologicky vysokých koncentracích kyslíku, které vedou ke zvýšené produkci kyslíkových radikálů. Nabízí se otázka, zda aktivita COX, a tedy rychlost respirace, je limitována nízkou intracelulární koncentrací kyslíku, jež udržuje nízký oxidační stres. Odpověď poskytuje oxygraf, jehož citlivost a rozlišení umožňuje analýzu kinetiky kyslíku při jeho velmi nízkých koncentracích ($p_{O_2} < 1$ kPa) (17).

Afinita COX ke kyslíku je v tomto případě vyjádřena pomocí p_{50} , tj. hodnoty parciálního tlaku kyslíku, při němž spotřeba kyslíku dosáhne poloviny maximální rychlosti (jedná se v podstatě o analogii Michaelisovy konstanty K_M v enzymatické kinetice). Stejně jako K_M je parametr p_{50} získán z hyperbolické funkce $J_{O_2} = (J_{\max} \cdot p_{O_2}) / (p_{50} + p_{O_2})$, která vyjadřuje závislost rychlosti spotřeby kyslíku J_{O_2} na parciálním tlaku kyslíku p_{O_2} . Ve vzorci jsou dále konstanty p_{50} a J_{\max} , maximální rychlost respirace při saturující koncentraci kyslíku (Obr. 2.6) (17-19). Naměřené hodnoty p_{50} izolovaných mitochondrií a malých buněk se nacházejí většinou v rozmezí 0,01 – 0,10 kPa, pokud nejsou přítomny inhibitory COX. Shodné p_{50} izolovaných mitochondrií a malých buněk naznačuje, že intracelulární gradienty kyslíku jsou zde při endogenní aktivitě malé. V souvislosti s nízkými intracelulárními

koncentracemi kyslíku se předpokládá, že mitochondriální respirace za normoxie funguje na hraně limitace kyslíkem. Při normoxickém intracelulárním p_{O_2} pod 2 kPa a hodnotě p_{50} 0,05 kPa je respirace limitována přibližně o 2 % (19).

Vlastní afinitu ke kyslíku představuje reciproká hodnota p_{50} ($1/p_{50}$), jež klesá se zvyšující se rychlostí oxidační fosforylace a je funkcí metabolického stavu, tudíž záleží na míře spřažení či rozspřažení respirace (18, 20, 21). Mitochondriální afinita ke kyslíku je obecně poměrně vysoká, což zřejmě souvisí s vysokou rezervní kapacitou COX. Proto byla jako parametr, který má lepší vypovídací hodnotu o afinitě ke kyslíku, diskutována tzv. katalytická účinnost (J_{max}/p_{50}) (18).



Obr. 2.6 Výpočet p_{50} .

Tok elektronů dýchacím řetězcem (respirace, J_{O_2}) vyneseny jako funkce parciálního tlaku kyslíku (p_{O_2}). (O) představují originální data, (o) data vyhlazená korekcí a plná čára hyperbolu proloženou vyhlazenými daty ($p_{50} = 0,06$ kPa). Převzato z Gnaiger et al. (18).

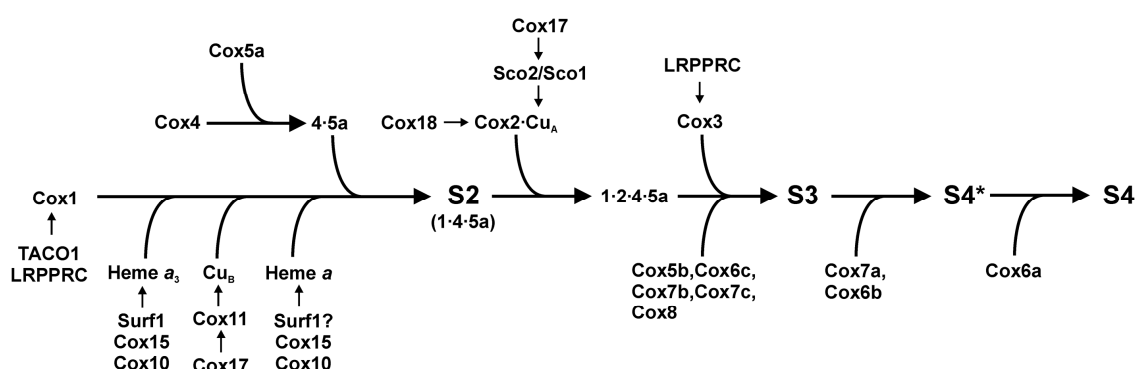
2.4 Biogeneze cytochrom c oxidasy

Biogeneze enzymového komplexu COX představuje další možné uplatnění jaderně kódovaných podjednotek, a to jak na úrovni skládání komplexu, tak v kontrole syntézy jednotlivých podjednotek a jejich isoform (13). Podjednotky Cox1 – Cox3 jsou syntetizovány mitochondriálními ribosomy, zatímco jaderně kódované podjednotky vznikají jako prekurzory v cytoplasmě. Mitochondriálně kódované podjednotky katalytického jádra COX

jsou hydrofobní proteiny, jejichž kotranslační zabudování do vnitřní mitochondriální membrány usnadňuje její integrální protein Oxa1. Jaderně kódované podjednotky jsou na základě N-koncové signální sekvence směřovány do mitochondrií a zde vloženy do membrány, aby mohly společně s mitochondriálně kódovanými podjednotkami a prostetickými skupinami složit funkční komplex, což je proces vyžadující součinnost dalších asemblačních faktorů. Dosud byly u lidí identifikovány autozomálně recesivní mutace v šesti jaderně kódovaných faktorech (*SURF1*, *SCO1*, *SCO2*, *COX10*, *COX15*, *LRPPRC*), jež jsou vyžadovány pro biosyntézu a asemblaci funkčního komplexu COX (12). Tyto mutace jsou jednou z příčin deficeience COX, která nejčastěji vede k fatální encefalopatii a manifestuje se jako Leighův syndrom.

2.4.1 Asemblace cytochrom c oxidasy

Asemblace COX je vícestupňový proces, jehož klíčové stupně byly navrženy na základě hromadění asemblačních intermediátů v buňkách (Obr. 2.7). Prvním krokem je integrace podjednotky Cox1 do vnitřní mitochondriální membrány, následovaná inkorporací dvou hemů typu *a* a Cu_B centra. Teprve pak dochází k asociaci s již zformovaným heterodimerem Cox4 · Cox5a za vzniku S2 intermediátu. K tomu se připojí podjednotka Cox2 obsahující Cu_A , a následně Cox3. Poté se ke komplexu přidají zbývající jaderně kódované podjednotky s výjimkou Cox6a, Cox6b a Cox7a, čímž vzniká S3 intermediát. Následná



Obr. 2.7 Předpokládaný model asemblace lidské COX.

Vyznačeny jsou jednotlivé intermediáty COX (S1 – S4, S1 intermediát je tvořen samotnou podjednotkou Cox1 integrovanou do membrány), posloupnost asociace jednotlivých podjednotek COX a asemblační faktory, které se účastní daných událostí. Převzato z Fornůsková et al. (22).

asociace zbylých podjednotek dokončí asemblaci holoenzymu COX, přičemž jako úplně poslední strukturní podjednotka je připojena Cox6a, jež zřejmě hraje roli ve skládání superkomplexů dýchacího řetězce. Maturovaný holoenzym COX asociuje s CoI a dimerním CoIII, čímž vytvoří superkomplex o molekulové hmotnosti přibližně 1,7 MDa (12, 22).

2.4.2 Asemblační faktor Surf1

U obratlovců je gen *SURF1* součástí velmi kompaktně uspořádaného a vysoce konzervovaného genového klastru *Surfeit*, který zahrnuje 6 genů. Příslušné Surf proteiny však navzájem nejsou funkčně ani strukturně příbuzné. Jejich aminokyselinová sekvence je ale vysoce homologní v rámci všech obratlovců a homologní proteiny byly identifikovány rovněž u nižších organismů (23, 24).

Produktem *SURF1* genu je 30 kDa velký hydrofobní protein lokalizovaný ve vnitřní mitochondriální membráně (25, 26), jehož vlastní funkce zůstává neznámá, ačkoli výsledky studií na buňkách kvasinek (zde je označován jako Shy1, tj. „Surf homolog of yeast“) i savců naznačují, že se jedná o asemblační faktor potřebný v časných fázích biogeneze COX (Obr. 2.7). Jeho absence či nefunkčnost působí hromadění intermediátů COX a drastické snížení množství plně asemblovaného komplexu COX jak v kvasinkách (27), tak u lidí (26, 28). Typická je především akumulace subkomplexu S2 (110 kDa), který je složen z podjednotek Cox1, Cox4 a Cox5a, což ukazuje na možnou roli Surf1 v dalším kroku biogeneze COX, a tím by byla účast na připojení podjednotky Cox2 k tomuto intermediátu (29-31). Jelikož Surf1-deficientní pacienti vykazují v některých tkáních snížený obsah mědi, mohl by tento protein hrát roli rovněž v regulaci buněčné homeostáze mědi (31). Poněkud odlišná funkce byla odhalena u bakteriálního Surf1 proteinu, jenž se zřejmě podílí na kotranslačním vložení hemu *a* do podjednotky Cox1. Bakteriální Surf1 vyvazuje hem *a* a vytváří tak ve vnitřní mitochondriální membráně pool proteinově vázaného hemu *a* dostupného pro maturaci podjednotky Cox1 (32).

Funkční analýzy buněk pacientů s deficiencí COX způsobenou jednou ze třiceti známých mutací v *SURF1* genu neodhalily žádnou výraznou změnu rychlosti endogenní respirace za normoxických podmínek (28). Surf1-deficientní buňky však vykazovaly sníženou afinitu COX ke kyslíku, což naznačuje, že energetická nedostatečnost u pacientů s Leighovým syndromem by mohla souviset i s omezením respirace v důsledku snížené afinity COX ke kyslíku při jeho fyziologicky nízkých koncentracích (33). Přitom měření

enzymatické aktivity odhalilo 70 – 90% pokles aktivity COX, který odpovídá tomu, že je v buňkách pacientů zachováno asi 15 % komplexu COX normální velikosti. ADP-stimulovaná respirace byla výrazně snížena a stejně tak membránový potenciál ve stavu 4. Proto se zdá, že absence proteinu Surf1 u pacientů vede k vytváření nekompletních komplexů COX, které zachovávají spíše vysokou elektrontransportní aktivitu, zatímco protontransportní aktivita je poškozena (28).

2.5 Inhibice cytochrom *c* oxidasy

2.5.1 Rezervní kapacita cytochrom *c* oxidasy

Za určitých experimentálních podmínek je pozorována rezervní kapacita COX, což znamená, že COX je v nadbytku ve srovnání s ostatními komplexy dýchacího řetězce (tj. CoI, CoII a CoIII), a proto určitý podíl její aktivity může být specificky inhibován, aniž by tato inhibice způsobila pokles celkové rychlosti respirace (18, 34-38). Publikované studie se však liší zjištěnou prahovou hodnotou, tzv. *thresholdem*, což je míra inhibice COX, která se již negativně projeví na spotřebě kyslíku. *Threshold* se odvíjí od typu vzorku (zda je měřena respirace buněk či izolovaných mitochondrií), tkáně, použitých substrátů, respiračního stavu i velikosti membránového potenciálu a jeho jednotlivých složek (37, 39).

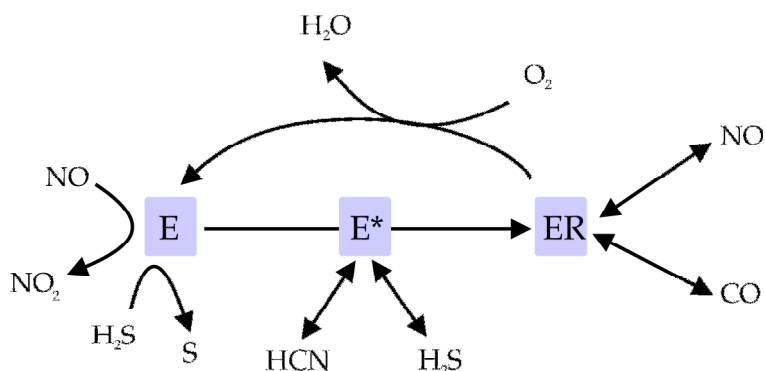
Jiným vyjádřením nadbytečné kapacity je kontrolní koeficient COX (40), který vyjadřuje míru regulace elektronového toku dýchacím řetězcem prostřednictvím COX. Vyšší kontrolní koeficient znamená nižší *threshold* a rezervní kapacitu COX, což je případ, kdy hraje COX důležitou roli v kontrole respirace a dýchacího řetězce, jelikož její „downregulace“ (například inhibice) výrazně ovlivní celkovou spotřebu kyslíku (35, 37). Vzhledem k zjištěným vysokým *thresholdům* u izolovaných mitochondrií byla kontrolní síla COX považována za zanedbatelnou, ale experimenty provedené na intaktních buňkách ukázaly, že princip kontroly elektronového toku prostřednictvím COX je složitější. Nízký *threshold* u endogenní respirace intaktních buněk se zvýší v respiračním stavu 4 vyvolaném inhibicí ATP synthasy oligomycinem (41, 42). Zdá se tedy, že při vysokých energetických nárocích COX vykazuje nízkou rezervní kapacitu a při nízkých naopak vysokou (37, 39).

2.5.2 Inhibitory cytochrom *c* oxidasy

COX je cílem působení řady toxických sloučenin, zejména plyných, a to oxidu dusnatého (NO) (43, 44), oxidu uhelnatého (CO), sulfanu či postaru sirovodíku (H₂S) a kyanovodíku (HCN). Inhibice COX je zodpovědná za jejich toxicitu, pokud se ve velkém množství dostanou z vnějšího prostředí do organismu, nicméně v poslední době byla ve větší či menší míře nalezena funkce těchto plynů v buněčných signálních drahách (45, 46). NO je důležitým intracelulárním poslem a podobná role je předpokládána pro CO a H₂S (47).

Pro specifické inhibitory COX je typická vazba do binukleárního centra s různým redoxním stavem, proto se liší svou afinitou k jednotlivým intermediátům COX existujícím v průběhu katalytického cyklu a mechanismem inhibice z hlediska kompetice o vazebné místo s kyslíkem (Obr. 2.8). NO a CO se váží do plně redukováného binukleárního centra, o něž kompetují s kyslíkem. Jejich inhibice COX je proto závislá na koncentraci kyslíku na rozdíl od HCN a H₂S, jež mají nejvyšší afinitu k částečně redukovanému binukleárnímu centru. NO (a mnohem méně častěji H₂S) může být také po své vazbě na COX oxidován. COX tak působí jako přirozený fyziologický detoxifikátor tohoto plynu (46). Pozorována byla však i schopnost COX oxidovat kyanid za vzniku kyanylového radikálu (48).

Existují i další více či méně specifické inhibitory COX jako azidy (45), disulfidy (49) či dikarbanonaboráty (50), ovšem právě kvůli jejich nízké specifitě nejsou z hlediska COX podstatné. Kyanidový anion ve formě plyného kyanovodíku anebo draselné či sodné soli kyseliny kyanovodíkové (většinou v roztoku) je tím nejvýznamnějším.



Obr. 2.8 Vazba plyných inhibitorů COX.

(E) představuje oxidovaný enzym, (E*) částečně redukovaný intermediát katalytického cyklu, (ER) redukovaný enzym. Reverzibilní inhibice naznačena obousměrnou šipkou, metabolická přeměna šipkou jednosměrnou. Upraveno dle Cooper et al. (46).

2.5.3 Inhibice cytochrom *c* oxidasy kyanidem

2.5.3.1 Mechanismus inhibice COX kyanidem

Kyanidový anion se váže na plně oxidovanou COX velmi pomalu, zatímco na částečně redukovaný enzym, jenž se vyskytuje v průběhu katalytického cyklu, vazba probíhá velmi rychle a s vysokou afinitou (51-53). Experimentálně bylo doloženo, že pro vyvolání rychlé vazby kyanidu na COX stačí vstup jednoho elektronu do komplexu COX. Tento elektron se v inhibovaném enzymu nachází převážně v redoxních centrech hem *a* a Cu_A . Iniciačním místem pro vazbu kyanidu je oxidované redoxní centrum Cu_B , kde navázaný kyanid brání vstupu elektronů do binukleárního reakčního centra a následné redukci kyslíku. Mezi kyanidem a kyslíkem nedochází ke kompetici, i když primárně oba ligandy interagují s Cu_B , jelikož se vážou na jeho odlišné oxidační stavy (kyslík se na rozdíl od kyanidu váže na plně redukované binukleární centrum COX) (46, 53). Kvůli hydrofobnímu charakteru binukleárního centra zanořeného uvnitř komplexu COX se inhibitory přednostně váží ve formě neutrální molekuly či aniontu, jehož vazbu doprovází proton. Kyanid je vzhledem ke svému vysokému pK_a přítomen vždy ve svém protonovaném stavu (HCN) (46).

Předpokládá se, že kyanid vázaný na COX vytváří jakýsi můstek spojující Cu_B a hem a_3 , čímž je částečně oslabeno jejich magnetické párování v binukleárním centru COX. To platí v případech, že je elektron přítomen na hemu *a* či Cu_A . Pokud je elektron lokalizován na Cu_B , můstek nemůže být realizován a kyanid se stane terminálním ligandem hemu a_3 (54).

Experimentálně byla rovněž potvrzena existence tkáňových rozdílů v citlivosti COX k inhibici kyanidem. V jednotlivých tkáních byly pozorovány odlišné thresholdy COX (34, 35). Tyto tkáňové rozdíly se pak projevují jako různá míra poškození jednotlivých orgánů u obětí kyanidové otravy a mohly by být způsobeny přítomností různých tkáňových isoform jaderně kódovaných podjednotek (55).

2.5.3.2 Kyanidová antidota založená na endogenních mechanismech detoxifikace organismu

Existuje několik typů antidot stimujících přirozené endogenní mechanismy detoxifikace organismu. Dle způsobu odstranění kyanidu je lze rozdělit do tří skupin – jedná se o oxidační činidla generující methemoglobin, sloučeniny kobaltu a donory síry pro

sulfurtransferasovou reakci. Ohledně jejich účinnosti nepanuje ve světě shoda, proto se jednotlivé státy liší v postupu léčby otravy kyanidem (56).

Dříve než kyanid pronikne do buněk, může být vycytán z krevního řečiště, a to jednak navázáním na oxidovaný hemoglobin, tzv. methemoglobin, za vzniku netoxického kyanomethemoglobinu, jednak na sloučeniny kobaltu. Methemoglobin, generovaný podáním dusitanů, má sice výrazně redukovanou afinitu ke kyslíku, ale na druhou stranu silně váže kyanid na Fe^{3+} . Při této léčbě je nutné současně sledovat poměr hemoglobinu a methemoglobinu v krvi, při hladinách methemoglobinu nad 40 % totiž dochází k ohrožení života kvůli nedostatečnému transportu kyslíku ke tkáním. Ovšem test na methemoglobin nedetekuje kyanomethemoglobin, což ztěžuje použití dusitanů či jiných oxidantů hemoglobinu (57). Také vitamin B_{12} neboli kobalamin s poměrně vysokou afinitou vyvazuje kyanid. A kobinamid, předposlední prekurzor v biosyntéze kobalaminu, váže kyanid dokonce s asi (10^{10}) krát větší afinitou než samotný kobalamin (58).

Největší podíl na přirozené detoxifikaci organismu má enzym rhodanasa (thiosíran:kyanid sulfurtransferasa) lokalizovaná v matrix mitochondrií, jež konvertuje kyanid na netoxický thiokyanatan (SCN^-), který je posléze vyloučen z těla močí. V těle, především v játrech a ledvinách, je dostatečné množství tohoto enzymu na to, aby zabránil letální inaktivaci COX, ovšem jako substrát vyžaduje sloučeniny obsahující síru, thiosíran, jejichž nedostatečný přísun značně snižuje kapacitu sulfurtransferasové reakce. Aktivitu intramitochondriálně lokalizované rhodanasy lze zvýšit intravenosním podáním roztoku thiosíranu sodného, i když z teoretického hlediska je tento postup sporný, jelikož je známo, že thiosíran špatně prochází přes membrány (59). Lepší výsledky by proto mohla přinést stimulace jiného typu sulfurtransferasové reakce, totiž 3-merkaptopyruvát:kyanid sulfurtransferasy, což je všudypřítomný enzym, lokalizovaný jak v cytoplasmě, tak v mitochondriích, jehož přirozeným substrátem je 3-merkaptopyruvát, meziprodukt degradace cysteinu. 3-Merkaptopyruvát je však chemicky velmi nestabilní, tudíž jako antidotum nepoužitelný. Tento problém je vyřešen podáním jeho prekurzorů, které jsou modifikovány různými protektivními skupinami zvyšujícími jejich stabilitu (60).

2.5.3.3 Protektivní účinky 2-oxokyselin proti kyanidové toxicitě

Kyanidový anion je nukleofil, který reaguje s různými karbonylovými sloučeninami za vzniku netoxických kyanohydrinů (61) (Obr. 2.9). Četné intermediáty energetického

metabolismu buňky nesou karbonylovou skupinu a podílejí se na snížení koncentrace kyanidu v buňce a tím na redukci jeho účinku, proto hepatocyty izolované z vyhladovělých potkanů jsou náchylnější ke kyanidové toxicitě (62).

O antagonismu kyanidu a 2-oxokyselin (α -ketokyselin) se zmínil již v roce 1955 Slater (63, 64), když pozoroval pozitivní vliv 2-oxoglutarátu (α -ketoglutarátu) na rychlost respirace inhibované kyanidem. V tomtéž roce Nosek et al. (65) sledoval polarograficky úbytek kyanidu v roztoku jeho reakcí s pyruvátem a ukázal, že tato reakce probíhá mnohem rychleji v basickém prostředí (pH 8) než v kyselém (pH 5,6). Následně ukázal výrazné zvýšení LD_{50} (tj. dávky, která je smrtelná pro 50 % experimentálních zvířat) kyanidu při současném podání pyruvátu v basickém roztoku. Od té doby jsou pyruvát a 2-oxoglutarát testovány v experimentech na zvířatech (66-72).

V medicínské praxi se dnes nejčastěji jako kyanidové antidotum používá kombinace thiosíranu a dusitanu, ale tato léčba skýtá určitá rizika, zmínit lze např. hypotenzi způsobenou dusitany (56). Naopak pyruvát, 2-oxoglutarát i dihydroxyaceton jsou fyziologicky přítomné sloučeniny, proto by mohly představovat bezpečná a účinná antidota, obzvláště v případech kyanidových otrav vyvolaných nadýcháním se kouře při požárech, v němž je přítomen kromě kyanidu rovněž CO. V těchto případech běžně používané dusitany generující methemoglobin k vychytání kyanidu představují nebezpečí, protože kapacita krve transportovat kyslík je zároveň snížena prostřednictvím vazby CO na hemoglobin (74).

Vzájemná srovnání protektivních účinků pyruvátu, 2-oxoglutarátu a dihydroxyacetonu nejsou jednotná. Většina studií upřednostňuje použití 2-oxoglutarátu (67-72, 75), avšak vzhledem k přítomnosti pyruvátového přenašeče ve vnitřní mitochondriální membráně je předpokládána ještě lepší účinnost pyruvátu (66, 76). Některá data však naznačují, že dihydroxyaceton by mohl být minimálně stejně účinným antidotem



Obr. 2.9 Reakce kyanidového aniontu s karbonylovou skupinou.

Reakce vzniku kyanohydrinu probíhá mechanismem nukleofilní adice kyanidového aniontu na karbonylovou skupinu. Převezato z Breitmaier et Jung (73).

(77). Shoda panuje, pokud jde o výraznější zvýšení LD_{50} , tj. zlepšení protektivního účinku, kombinací 2-oxokyseliny s thiosíranem (66, 67, 69).

Nevýhoda 2-oxokyselin spočívá v tom, že k dosažení uspokojivého účinku musí být podány velmi rychle po intoxikaci, což znemožňuje jejich aplikaci při léčení akutních kyanidových otrav. Uspokojivě ale bylo testováno uplatnění protektivního účinku 2-oxoglutarátu v případech chronického vystavení subletálním dávkám kyanidu, jež se může týkat pracovníků v chemickém průmyslu, kuřáků, či jedinců, v jejichž potravě se dlouhodobě vyskytují kyanogenní složky (např. amygdalin) (68-72, 74).

V jednom z mála *in vitro* experimentů s COX purifikovanou z hovězího srdce sledovali Delhumeau et al. (76) po podání pyruvátu obnovu aktivity COX kompletně inhibované 250 μ M KCN. Maximální obnovy aktivity COX (tj. 25 – 30 % aktivity kontroly) bylo dosaženo podáním 48 mM pyruvátu. Jedním z cílů této diplomové práce bylo ověřit výsledky zmíněné studie na purifikovaném enzymu na vyšší úrovni, a to intaktních mitochondriích, a přitom se zabývat podrobněji jednotlivými funkčními aspekty COX.

3 Materiál a metody

3.1 Seznam použitých chemikálií

Obvyklé laboratorní chemikálie jako anorganické soli, kyseliny či zásady nejsou zahrnuty v seznamu a byly zakoupeny u výrobců Sigma (USA) nebo Lachema (ČR). Chemikálie uvedené v seznamu pocházejí od Sigmy, pokud není uvedeno jinak. Všechny použité chemikálie byly alespoň čistoty p. a.

Acetyl-CoA (sodná sůl)	2-Merkaptoethanol (Serva, Německo)
ADP	Methanol (Penta, ČR)
Antimycin A	Myxothiazol
Askorbát sodný	NADH
Bio-Rad Protein Assay kit, kat. č. 500-0006 (Bio-Rad, Německo)	Oligomycin
BSA (Hovězí sérový albumin)	Oxalacetát
Cytochrom <i>c</i> z hovězího srdce	PageRuler™ Prestained Protein Ladder, kat. č. SM0671 (Fermentas, Kanada)
Digitonin	Penicilin/streptomycin (Gibco, USA)
DMEM (Gibco, USA)	PVC Neralit 702 (Spolana Neratovice, ČR)
DMSO	Pyridin
DTNB	Pyruvát sodný
ECL Western Blotting Substrate (Pierce, USA)	Rotenon
EDTA	SDS
FBS	Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)
FCCP	Sukcinát sodný
Geneticin (G418, disulfátová sůl)	Tetrafenylfosfonium chlorid
Glutamát sodný	THF
Guanidinhydrochlorid	TMPD
Chloramin T (trihydrát)	Tris
Kyselina barbiturová	Trypsin
LM (n-dodecyl β -D-maltosid)	Tween-20
Malát sodný	

3.2 Izolace mitochondrií z jater potkana

Potkani kmene Wistar (BioTest Konárovice, ČR) o hmotnosti 220 – 250 g byli chováni při 23 °C s volným přístupem k vodě a krmení standardní laboratorní dietou (DOS 2B Velaz, ČR) *ad libitum*. Pokusným zvířatům bylo den před experimentem odebráno krmivo a následující den byla usmrcena dislokací krční páteře v CO₂ narkóze. Všechny pokusy na zvířatech byly schváleny odbornou komisí pro ochranu zvířat FgÚ AV ČR a splňovaly pokyny National Institute of Health (NIH) pro humánní zacházení se zvířecími subjekty.

Mitochondrie z jater potkana (RLM) byly připraveny diferenciální centrifugací dle Bustamante et al. (78). Izolační médium obsahovalo 320 mM sacharosu, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA a 0,5 g.L⁻¹ BSA, pH 7,4. Všechny kroky izolace byly provedeny na ledu či při 4 °C a použita byla centrifuga Sigma 3K18, rotor Sigma #19776-H.

Játra byla vyňata z břišní dutiny usmrceného potkana, očištěna od pojivové tkáně a omyta v izolačním médiu. Po zvážení byla rozstříhána na jemné fragmenty v malém množství izolačního média. Poté byla připravena cca 10% (w/v) suspenze (< 50 mL), převedena do vychlazeného skleněného homogenizátoru a homogenizována třemi kompletními tahy rotujícího (600 rpm) teflonového pístu. Homogenát byl převeden do vychlazené centrifugační zkumavky (50 mL) a centrifugován 4 min při 830 × g. Supernatant byl přefiltrován přes 4 vrstvy gázy do nové centrifugační zkumavky (50 mL) a centrifugován 15 min při 5190 × g. Tento supernatant byl následně odstraněn a ze stěn zkumavky byly gázou setřeny lipidy. Sediment obsahující mitochondriální frakci byl resuspendován v původním objemu izolačního média a dvakrát promyt izolačním médiem – při prvním promytí byl centrifugován 10 min při 11200 × g, při druhém promytí byl resuspendován v polovině původního objemu izolačního média (bez BSA) a centrifugován 10 min při 14400 × g. Nakonec byl supernatant odstraněn a sediment s mitochondriemi resuspendován v 1 – 2 mL izolačního média.

3.3 Tkáňové kultury

Jako buněčný model sloužily fibroblasty získané z myši kontrolní a z myši COX-deficientní v důsledku absence proteinu Surf1 po knockoutu *SURF1* genu. Rekombinantní *SURF1*^{-/-} myši byly připraveny v laboratoři prof. Zevianiho (Istituto Neurologico Carlo Besta, Milán, Itálie) na základě inserce loxP sekvence do otevřeného

čtecího rámce *SURF1* genu, a to konkrétně do exonu 7 (79). Tato inserce má za následek vznik zkráceného a vysoce nestabilního proteinu.

Pro experimenty byly použity immortalizované myší fibroblasty. Buněčná linie vznikla na základě transfekce primárních fibroblastů virovým vektorem obsahujícím geny kódující velký a malý T-antigen viru SV40 a zároveň *NEO* gen zodpovědný za rezistenci vůči antibiotiku geneticinu, což umožňuje kontinuální selekci stabilně transfekovaných klonů.

Buňky byly kultivovány na Petriho miskách (Ø 10 cm) v 12 mL DMEM média (Dulbecco's modified Eagle medium) s 10% (v/v) fetálním hovězím sérem (FBS) a 20 mM HEPES v přítomnosti antibiotik – geneticinu (G418) o koncentraci 200 µg.mL⁻¹, penicilinu 10 U.mL⁻¹ a streptomycinu 10 µg.mL⁻¹ (prevence bakteriálních kontaminací). Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂. Dle potřeby byly buňky dále pasážovány či sklizeny pro použití v experimentech.

Ve sterilním boxu probíhala první část sklizení, pokud bylo nutno zajistit pokračování nasazené linie (pasážování). Kultivační médium bylo odsáto a misky byly propláchnuty PBS (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2 – 7,3, upraveno NaOH). Po odsátí PBS bylo přidáno 1,5 mL roztoku 0,05% (w/v) trypsinu s 0,02% (w/v) EDTA v PBS. Následkem toho se adherované buňky uvolnily ze dna misky (do 3 min). Po uvolnění všech buněk bylo přidáno 5 mL kultivačního média (DMEM s FBS a dalšími přidanými komponentami), čímž byla zastavena trypsinizace. Suspenze buněk byla opatrně promíchána a 1 – 2 mL byly naneseny na novou misku s připraveným kultivačním médiem, zbytek byl slit do centrifugační zkumavky (15 mL).

Sklizení bylo dokončeno již mimo sterilní box na ledu či při 4 °C (použita centrifuga Sigma 3K18, výkyvný rotor Sigma #11333). Buňky byly nejprve centrifugovány 5 min při 600 × g. Supernatant byl poté odstraněn a sediment tvořený buňkami resuspendován ve vychlazeném PBS, jehož objem byl doplněn na cca 10 mL, a centrifugován opět 5 min při 600 × g. Tento krok promývání byl dvakrát opakován. Supernatant byl nakonec slit a buňky resuspendovány v určitém objemu PBS či inkubačního média dle typu experimentu. Pro použití na TPP⁺-selektivní elektrodě byl buněčný pelet resuspendován cca v 0,5 mL PBS, zatímco pro měření na oxygraf ve větším objemu inkubačního média.

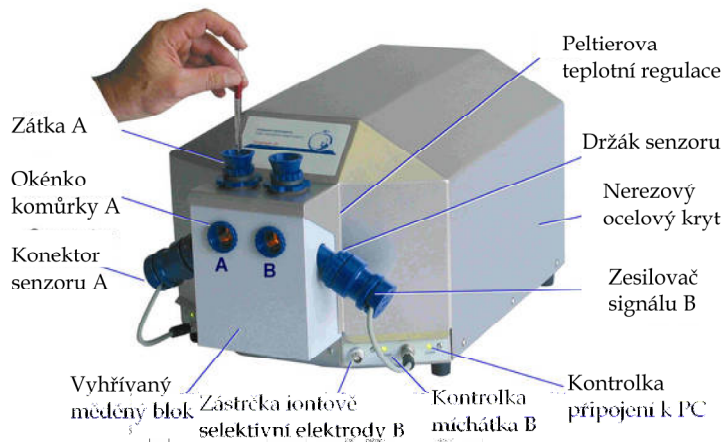
Počet buněk byl stanoven klasicky počítáním v Bürkerově komůrce. Buňky byly počítány v 5 velkých čtvercích, z nichž každý má objem 10⁻⁴ mL (délka strany 1 mm, hloubka 0,1 mm, tzn. objem 0,1 mm³ = 10⁻⁴ mL). Koncentrace buněk v suspenzi (počet buněk.mL⁻¹) byla získána vynásobením průměrného počtu buněk v 1 velkém čtverci faktorem 10⁴.

3.4 Stanovení koncentrace proteinu metodou dle Bradfordové

Obsah proteinu ve vzorku byl stanoven metodou dle Bradfordové (80). K přípravě standardů na kalibrační přímku byl použit zásobní roztok BSA o koncentraci $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$. Jednotlivé standardy v $1 \text{ mL H}_2\text{O}$ obsahovaly $0 - 20 \text{ } \mu\text{g}$ BSA (jednotlivé mezikroky $4 \text{ } \mu\text{g}$). Vzorky (zředěné dle potřeby) byly rovněž napipetovány do zkumavek, doplněny vodou do výsledného objemu 1 mL a sonikovány po dobu 20 s (20% amplituda, sonikátor Bandelin UW 3100, sonda MS 72). Ke každému standardu i vzorku bylo přidáno $250 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku Bio-Rad protein assay kit a směs byla ihned promíchána na vortexu. Po cca 2 min inkubace byla v polystyrenové (PS) kyvetě s délkou světelného paprsku 1 cm změřena absorbance při vlnové délce 595 nm (Eppendorf BioPhotometer). Na základě kalibrační přímky byl vypočítán obsah proteinu ve vzorcích (vyjádřen v mg.mL^{-1}).

3.5 Měření respirace

K měření respirace – spotřeby kyslíku tkáňových homogenátů, buněk či izolovaných mitochondrií je používán respirometr s vysokým rozlišením neboli oxygraf (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Rakousko, Obr. 3.1) (17). Jedná se o Clarkovu elektrodu selektivní pro kyslík s polarografickým způsobem detekce, která vyniká svou citlivostí a umožňuje měřit respiraci velmi malého množství vzorku. Polarografický kyslíkový senzor je tvořen platinovou katodou a Ag/AgCl anodou, jako elektrolyt je použit roztok 1 M KCl . Měření spotřeby kyslíku probíhá za stálého míchání (750 rpm) při 30°C současně ve dvou



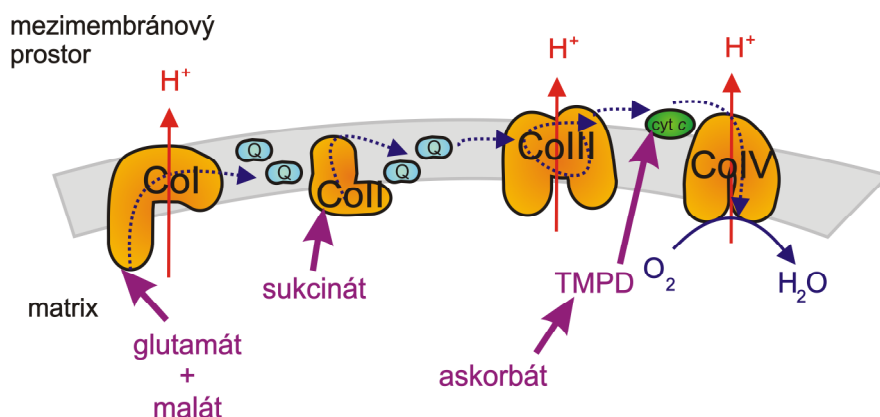
Obr. 3.1 Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Rakousko.

Vyznačeny základní komponenty oxygrafu. Upraveno dle www.orooboros.at.

uzavřených komůrkách o objemu 2 mL. Data jsou ukládána v intervalech 2 s a analyzována pomocí softwaru *DatLab4* (Oroboros Instruments, Rakousko). Rychlost respirace, tj. spotřeba kyslíku, je vypočítána jako negativní derivace koncentrace kyslíku v čase a vyjádřena v $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg proteinu}^{-1}$ (81).

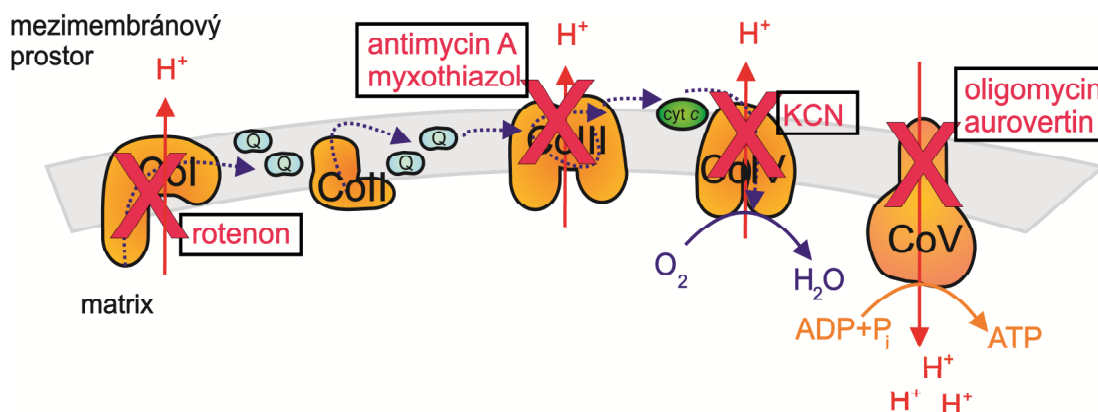
Pokud jako experimentální model slouží buňky, lze měřit spotřebu kyslíku jednak intaktních buněk v kultivačním médiu, tzv. rutinní (endogenní) respiraci, a jednak buněk permeabilizovaných (např. digitoninem). Respirace permeabilizovaných buněk ($0,1 - 0,3 \text{ mg proteinu} \cdot \text{mL}^{-1}$) a izolovaných mitochondrií ($0,05 - 0,30 \text{ mg proteinu} \cdot \text{mL}^{-1}$) vyžaduje dodání substrátů dýchacího řetězce (Obr. 3.2), buď samostatně pro jednotlivé komplexy, či v kombinaci, a měří se ve speciálním inkubačním médiu (tzv. K-médiu), jehož iontové složení a pH napodobují intracelulární prostředí (80 mM KCl , 10 mM Tris-HCl , 3 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA , $5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.3).

Při měření respirace jsou také používány inhibitory jednotlivých komplexů dýchacího řetězce (Obr. 3.3). Respirace se sukcinátem (10 mM) se měří v přítomnosti rotenonu ($1 \text{ } \mu\text{M}$), čímž se zabrání oxidaci endogenního NADH a následnému hromadění oxalacetátu na vstupu do Krebsova cyklu, který by díky své strukturní podobnosti se sukcinátem (jedná se o dikarboxylové kyseliny, které se liší o jeden atom uhlíku ve svém řetězci) mohl kompetitivně inhibovat právě sukcinát dehydrogenasu. TMPD s askorbátem ($1 \text{ mM TMPD} + 5 \text{ mM askorbát}$ použit k měření respirace RLM, $0,6 \text{ mM TMPD} + 2 \text{ mM askorbát}$ k měření



Obr. 3.2 Substráty dýchacího řetězce.

Na schématu dýchacího řetězce jsou ukázána místa vstupu elektronů z používaných substrátů. Glutamát a malát jsou oxidovány v Krebsově cyklu, a tudíž elektrony přes redukováný kofaktor NADH vstupují do dýchacího řetězce na NADH dehydrogenase (CoI), kdežto elektrony získané oxidací sukcinátu na úrovni sukcinát dehydrogenasy (CoII). Arteficiální elektronový donor TMPD (*N,N,N',N'*-tetramethylfenylendiamin) dodává elektrony na cyt c, potažmo COX, a zpětně se redukuje přijetím elektronů z askorbátu.



Obr. 3.3 Vybrané inhibitory dýchacího řetězce.

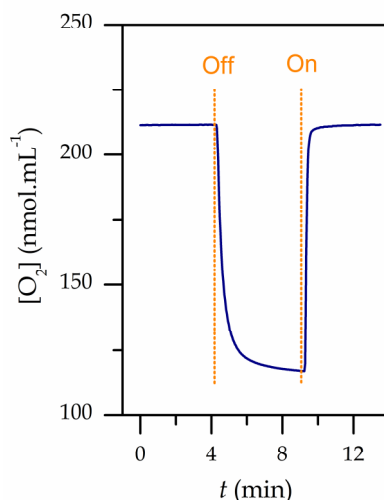
Na schématu dýchacího řetězce jsou ukázána konkrétní místa působení inhibitorů dýchacího řetězce. Rotenon inhibuje NADH dehydrogenasu (CoI), antimycin A a myxothiazol komplex cytochromů bc_1 (CoIII), kyanidy (KCN, NaCN) COX (CoIV) a ATP synthasa je inhibována oligomycinem, který působí na její F_0 část, a aurovertinem, který blokuje F_1 část.

respirace permeabilizovaných buněk) představují arteficiální systém zásobující elektrony přímo COX, a tím umožňují sledovat elektrontransportní aktivitu pouze tohoto komplexu. To je zajištěno současnou aplikací antimycinu A, příp. myxothiazolu ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), které zainhibují CoIII, zablokují tedy přísun elektronů z endogenních substrátů procházejících dýchacím řetězcem na COX. Místo působení antimycinu A a myxothiazolu na CoIII se liší, ale pro daný účel je jejich použití zcela zaměnitelné.

Aby byla získána co nejpřesnější hodnota respirace s TMPD a askorbátem, je nutno od celkové spotřeby kyslíku odečíst autooxidaci TMPD a askorbátu jako spotřebu kyslíku, která je naměřena po přidání $250 \mu\text{M}$ KCN, tj. po zainhibování COX. Navíc autooxidace TMPD a askorbátu je závislá na koncentraci kyslíku v médiu (Obr. 3.6), proto při sledování vlivu KCN na respiraci s TMPD a askorbátem bylo nutné dbát na to, aby hodnoty spotřeby kyslíku byly odečítány při přibližně stejné aktuální koncentraci kyslíku v inkubačním médiu.

3.6 Výpočet p_{50}

Na základě oxygrafických měření lze rovněž vypočítat příslušnou hodnotu p_{50} pro kyslík, jež vypovídá o afinitě zkoumaného systému ke kyslíku. Mitochondriální respiraci lze popsat hyperbolickou funkcí parciálního tlaku kyslíku $J_{O_2} = (J_{\max} \cdot p_{O_2}) / (p_{50} + p_{O_2})$ (kap. 2.3.2.3). Proložení dat hyperbolou provedené softwarem *DatLab2* v makru " p_{50} " umožňuje stanovit hodnotu p_{50} , zdánlivé K_M pro kyslík (Obr. 2.6).



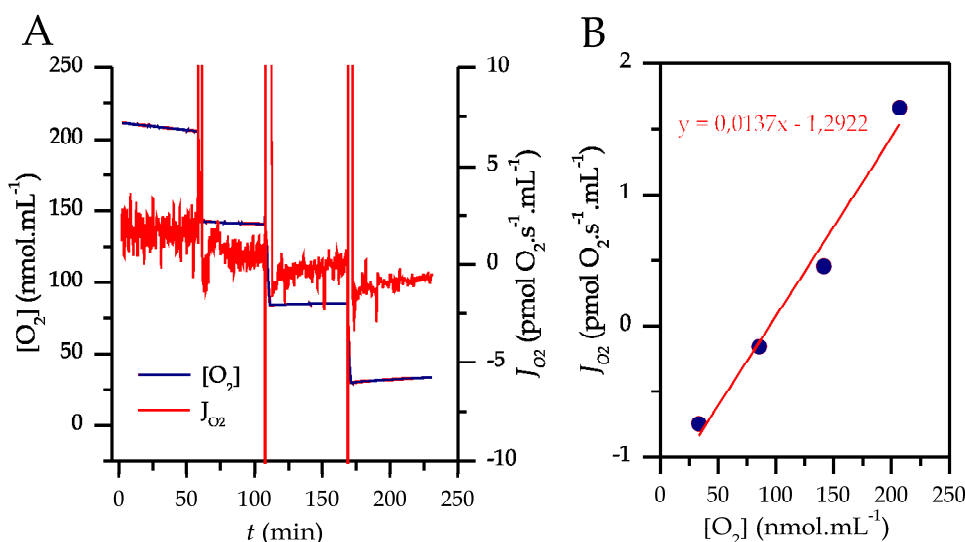
Obr. 3.4 Určení exponenciální časové konstanty τ .

Vyznačeno vypnutí ("Off") a následné zapnutí ("On") míchátko v uzavřené komůrce oxygrafu s inkubačním médiem.

Pro zpřesnění výpočtu p_{50} je nutné zadat několik korigujících parametrů. Prvním z nich je exponenciální časová konstanta τ , která vyjadřuje zpoždění odpovědi senzoru (17). Po vypnutí míchátko je zpomalena difúze kyslíku k elektrodě, a proto detekovaná koncentrace kyslíku v médiu poklesne. Zapnutí míchátko má efekt opačný (Obr. 3.4). Konstanta τ je stanovena proložením exponenciálního nárůstu signálu po zapnutí míchátko softwarem *DatLab2* v makru "*timecons*" a její hodnota se pohybuje v rozmezí 1,5 – 3 s.

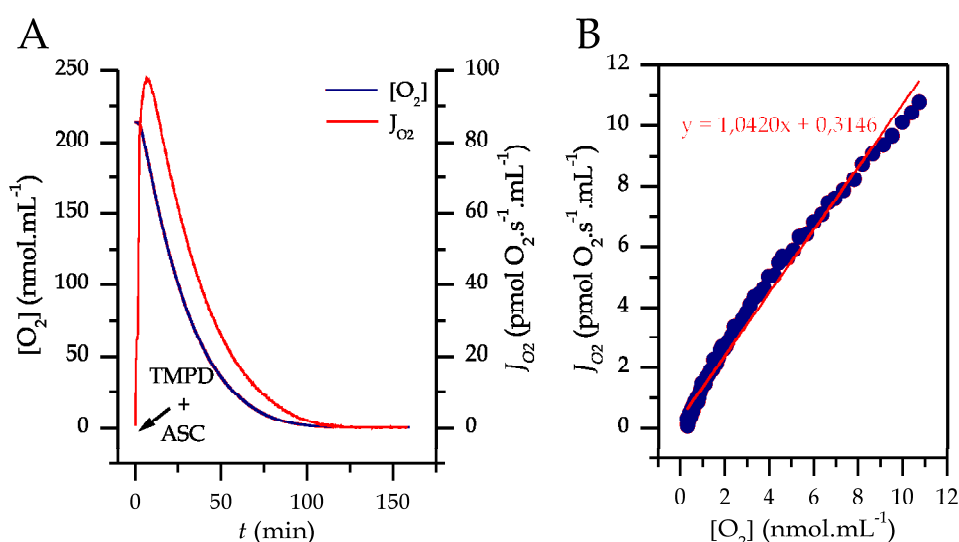
Naměřený signál je rovněž nutné korigovat vzhledem ke spotřebě kyslíku samotnou elektrodou a ke zpětné difúzi kyslíku (17). Při vysoké koncentraci kyslíku v médiu dochází k jeho adhezi na stěny komůrky, míchátko apod., čímž se zdánlivě spotřeba kyslíku buňkami či mitochondriemi dále zvyšuje, zatímco při nízkých koncentracích kyslíku v komůrce oxygrafu se tento adherovaný kyslík uvolňuje zpět do média, a tím se spotřeba kyslíku zdánlivě snižuje (18). Tento signál na pozadí je lineárně aproximován (Obr. 3.5) a korekce je aplikována při každém měření na oxygrafu, ale pro analýzu p_{50} je v podstatě esenciální. Při analýze p_{50} je "background" spotřeba kyslíku měřena v inkubačním médiu, ve kterém je měřen vzorek – u rutinní respirace se jedná o kultivační médium, u respirace se sukcinátem o inkubační médium, jež je v případě respirace s TMPD a askorbátem doplněno o tyto dva substráty (Obr. 3.6). Hovoříme pak o "chemical background", jelikož spotřebu kyslíku korigujeme i na autooxidaci substátů. Autooxidaci askorbátu a TMPD lze v celém rozsahu koncentrací kyslíku aproximovat lineárně, ale ke stanovení p_{50} byla lineární aproximace pro větší přesnost provedena pouze v rozmezí koncentrací kyslíku 0 – 11 μM (nmol.mL^{-1})

(Obr. 3.6B), jelikož hodnota p_{50} je určována v oblasti parciálního tlaku kyslíku $p_{O_2} < 1,1$ kPa (faktor rozpustnosti kyslíku v inkubačním médiu je $9,3 \mu\text{M.kPa}^{-1}$, $1,1$ kPa tedy odpovídá $10,23 \mu\text{M}$ kyslíku) (17).



Obr. 3.5 Signál elektrody na pozadí – „background“ korekce.

(A) Výstup z oxygrafu. J_{O_2} , negativní derivace $[O_2]$ podle času, vyjadřuje rychlost spotřeby kyslíku. Se snižující se koncentrací kyslíku v médiu se snižuje spotřeba kyslíku až do záporných hodnot, kdy kyslík vlivem zpětné difúze zdánlivě přibývá. (B) Lineární aproximace signálu na pozadí.



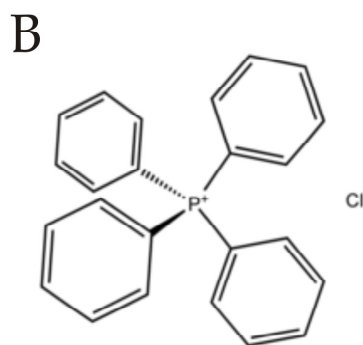
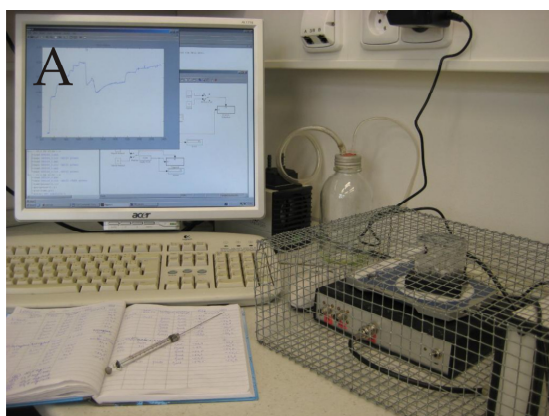
Obr. 3.6 Autooxidace TMPD a askorbátu – „chemical background“ korekce.

(A) Autooxidace TMPD a askorbátu změřená na oxygrafu a její pokles se snižující se koncentrací kyslíku. J_{O_2} , negativní derivace $[O_2]$ podle času, vyjadřuje rychlost spotřeby kyslíku. (B) Lineární aproximace autooxidace askorbátu a TMPD v rozmezí $0 - 11 \mu\text{M } O_2$.

3.7 Měření membránového potenciálu

Změny membránového potenciálu v čase v závislosti na přidání různých substrátů či inhibitorů dýchacího řetězce je možné sledovat prostřednictvím TPP⁺-selektivní elektrody (Obr. 3.7A). Použita byla metodika vypracovaná Lábajovou et al. (82). TPP⁺ (tetrafenylfosfonium) je kation (používán tetrafenylfosfonium chlorid TPP⁺Cl⁻, Obr. 3.7B), který v závislosti na velikosti membránového potenciálu prochází přes vnitřní mitochondriální membránu. V případě vysokého membránového potenciálu se matrix mitochondrií jeví jako záporně nabitá, TPP⁺ tedy putuje dovnitř mitochondrií, čímž se sníží jeho aktuální koncentrace v médiu, a naopak, pokud membránový potenciál klesne, TPP⁺ vytéká z mitochondrií do média. Změny koncentrace TPP⁺ v médiu se projevují jako změny napětí detekované pomocí TPP⁺-selektivní elektrody a Ag/AgCl referenční elektrody. Toto zařízení lze použít ke sledování změn membránového potenciálu jak u izolovaných mitochondrií, tak u digitoninem permeabilizovaných buněk a tkáňových homogenátů. Nutnost permeabilizace buněk plyne z neschopnosti TPP⁺ pronikat přes plasmatickou membránu. Potenciál se měří při pokojové teplotě za stálého míchání v komůrce umístěné ve Faradayově kleci v 1 nebo 2 mL inkubačního média (K-média) v případě permeabilizovaných buněk (2 – 3 mg.mL⁻¹), resp. izolovaných mitochondrií (0,5 mg.mL⁻¹). K zaznamenání a zpracování signálu se používá software MATLAB/Simulink (The Math Works, Inc., USA).

Příprava TPP⁺-selektivní membrány vyžaduje několik kroků. Nejprve se připraví roztok A (619,12 mg PVC, 2,38 mL tetrahydrofuranu a 1,44 mL dioktylfthalátu), přičemž



Obr. 3.7 TPP⁺-selektivní elektroda.

(A) Elektroda umístěná ve Faradayově kleci a napojená na PC. (B) Tetrafenylfosfonium chlorid (TPP⁺Cl⁻).

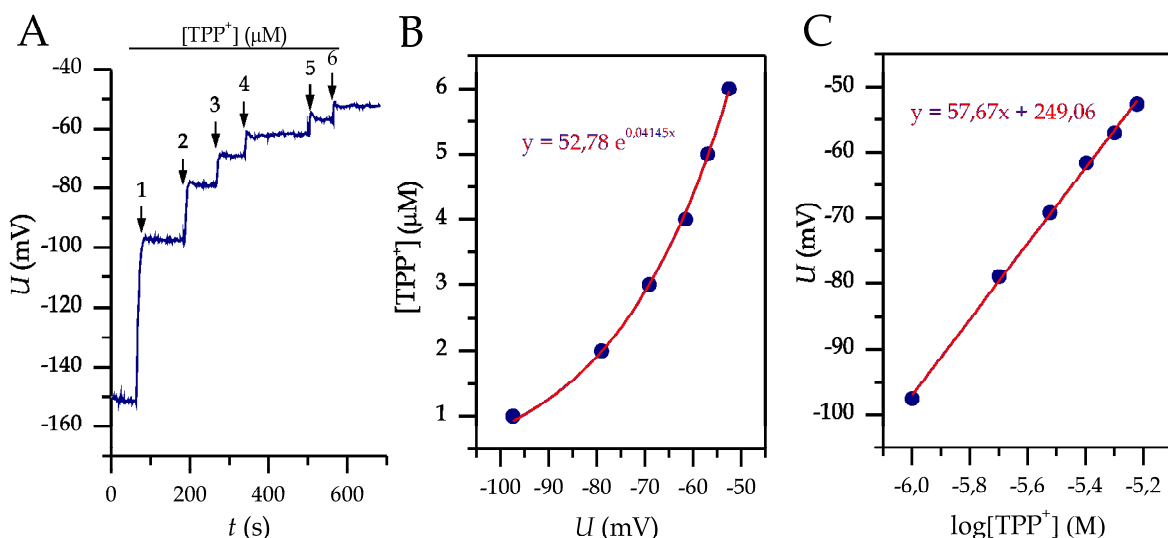
nejdříve se rozpustí PVC v THF (nejlépe nechat 2 – 3 hodiny na třepačce) a poté se přidá DPH. Roztok B vznikne rozpuštěním 3,28 mg trihydrátu tetrakis[3,5-bis-(1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-methoxy-2-propyl)fenyl]borátu sodného ve 4,95 mL THF. Roztoky A a B se smíchají a nalijí na Petriho misku o průměru 89 mm, jež se přikryje filtračním papírem a zatíží víčkem misky pro zpomalení odpařování, a směs se nechá přes noc odpařovat v digestoři.

Membrána je připevněna na konci elektrody, čímž odděluje 10 mM TPP^+Cl^- uvnitř elektrody a médium v komůrce, kde se jeho koncentrace pohybuje v rozmezí 0 – 4 μM v případě buněk, resp. 0 – 6 μM v případě mitochondrií. Takovýto rozdíl koncentrací způsobuje vznik potenciálu na membráně, který je zaznamenáván jako napětí. Před každým měřením musí být elektroda zkalibrována, což je provedeno postupným zvyšováním koncentrace TPP^+ s 1 μM kroky až na požadovanou maximální koncentraci (4, resp. 6 μM) a zaznamenáváním příslušného naměřeného napětí. Tím je každé koncentraci TPP^+ přiřazeno určité detekované napětí, přičemž mezi napětím a koncentrací TPP^+ je závislost exponenciální, tj. lineární závislost je mezi napětím a logaritmem koncentrace TPP^+ , jak lze odvodit z rovnice Nernstova potenciálu (83)

$$\Delta E = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{c_o}{c_i}, \text{ tj. } \Delta E = -\frac{RT}{zF} \cdot \frac{\log \frac{c_o}{c_i}}{\log e} = -0.0585 \cdot \log \frac{c_o}{c_i},$$

kde R je univerzální plynová konstanta ($8,314 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T absolutní teplota, z nábojové číslo, F Faradayova konstanta ($9,65 \cdot 10^4 \text{ C.mol}^{-1}$), c_o a c_i koncentrace kationtu vně a uvnitř membránového kompartmentu. Z této rovnice rovněž vyplývá, že směrnice kalibrační přímky by se měla při pokojové teplotě ($T = 298,15 \text{ K}$) rovnat přibližně 58 – 59 mV, což číselně vyjadřuje poslední krok odvození, tzv. Donnanova rovnováha, která popisuje distribuci kationu na membráně. Elektroda byla po kalibraci k měření použita, pokud byla její odpověď lineární se směrnici $58 \pm 10 \text{ mV}$ (Obr. 3.8 představuje ukázkou výstupu z kalibrace).

Na základě exponenciální kalibrační křivky lze k naměřenému napětí dopočítat příslušnou koncentraci TPP^+ . Potenciál pak můžeme vyjádřit jako $p\text{TPP}$, tedy přirozený logaritmus koncentrace TPP^+ (μM), který je přímo úměrný membránovému potenciálu. Při použití partičních koeficientů, které berou v úvahu nespecifické vyvázání TPP^+ na různé mitochondriální struktury, lze vypočítat mitochondriální membránový potenciál



Obr. 3.8 Kalibrace TPP⁺-selektivní elektrody.

(A) Napětí zaznamenané elektrodou. Šípky označují přidávky TPP⁺ s udanou výslednou koncentrací. (B) Exponenciální vztah mezi napětím a koncentrací TPP⁺. (C) Vynesení napětí proti logaritmu koncentrace TPP⁺ umožňuje zhodnotit odpověď elektrody (zde směrnice 57,67).

v absolutních hodnotách, které jsou dle konvence záporné. Výpočet se provádí dle rovnice popsané Zolkiewskou et al. (84):

$$\Delta\psi_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{V_0[TPP^+]_0 / [TPP^+]_t - V_t - K_0P}{V_mP + K_iP},$$

kde R je univerzální plynová konstanta ($8,314 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T absolutní teplota, F Faradayova konstanta ($9,65 \cdot 10^4 \text{ C.mol}^{-1}$), V_0 objem média před přidáním a V_t objem po přidání vzorku, substrátu či inhibitoru, V_m objem mitochondriální matrix ($1 \text{ μL.mg proteinu}^{-1}$) (85), $[TPP^+]_0$ a $[TPP^+]_t$ jsou koncentrace TPP⁺ před přidávkou a po čase t , P je obsah mitochondriálního proteinu (mg), K_0 a K_i představují zdánlivý vnější a vnitřní partiční koeficient TPP⁺, který je roven 14,3, respektive 7,9 $\text{μL.mg proteinu}^{-1}$. Tento přepočet na skutečnou hodnotu membránového potenciálu je možný pouze pro izolované mitochondrie.

Při porovnávání membránového potenciálu byla využita především hodnota pTPP, od které byla vždy odečtena hodnota pTPP po přidání rozpřahovače FCCP (1 μM). FCCP způsobí úplné rozpřážení mitochondrií, na jejich membráně tedy není žádný potenciál a veškeré TPP⁺ by mělo být v médiu. Rozdíl mezi naměřenou a maximální koncentrací TPP⁺ představuje nespecificky vyvázané TPP⁺, které tvoří pozadí experimentu.

3.8 SDS elektroforéza a Western Blot

3.8.1 Příprava vzorků na SDS elektroforézu

K charakterizaci složení dýchacího řetězce kontrolních a *SURF1*^{-/-} myších fibroblastů byla využita SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) s tricinovým pufracním systémem, kdy dochází k separaci jednotlivých proteinů na polyakrylamidovém gelu, následovaná imunochemickou detekcí na PVDF membráně (Western Blot). Vzorky byly připraveny z buněk použitých k měření respirace a výpočtu p_{50} na oxygrafu, použita byla centrifuga Sigma 3K18 a rotor Sigma #12154-H.

Z komůrky oxygrafu bylo odebráno 1,5 mL suspenze do mikrozkušavky a centrifugováno 10 min při $10000 \times g$. Poté byl odstraněn supernatant a sediment obsahující buňky resuspendován v 1 mL PBS. Pokud byly buňky při oxygrafickém měření permeabilizované digitoninem, před resuspendováním bylo potřeba sediment 10 s na ledu sonikovat ve 200 μ L PBS (20% amplituda, sonikátor Bandelin UW 3100, sonda MS 72) a teprve pak bylo doplněno PBS na celkový objem 1 mL a sediment byl resuspendován pipetou. Následovala opět centrifugace 10 min při $10000 \times g$. Dále byl odstraněn supernatant a sediment resuspendován ve 200 μ L vzorkového pufru na elektroforézu (2% (v/v) 2-merkptoethanol – redukuje disulfidické vazby, 4% (w/v) SDS – uděluje proteinům záporný náboj, přičemž na 1 g připadá 1,4 g navázaného SDS, 50 mM Tris-HCl, 10% (v/v) glycerol – zvyšuje hustotu vzorku, čímž usnadňuje jeho nanesení na gel). Nakonec byl vzorek temperován 5 – 10 min v bločku při 90 °C a poté uložen v - 80 °C.

3.8.2 SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

SDS-PAGE probíhá při denaturujících podmínkách a proteiny se separují na základě své molekulové hmotnosti vlivem navázaného SDS, tudíž putují v elektrickém poli ve směru od katody k anodě. Mezi skla sestavené vertikální elektroforetické aparatury (Bio-Rad MiniProtean II, tloušťka gelu 1 mm) bylo nejprve naneseno cca 4,5 mL 10% separačního gelu. Ten byl převrstven destilovanou vodou. Po ztuhnutí separačního gelu byla odsáta H₂O a nanesen 4% zaostřovací gel, do něhož byl zanořen hřebínek (příprava gelů viz Tab. 3.1). Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje pomocí volných radikálů poskytovaných peroxodisíranem amonným (AP), který způsobuje štěpení vazeb O – O v molekule kyslíku. K urychlení polymerizace se používá katalyzátor tetramethylethylendiamin (TEMED), který podporuje tvorbu volných radikálů peroxodisíranu amonného.

	4% zaostřovací gel (2,5 mL)	10% separační gel (10 mL)
H ₂ O	1,68 mL	3,64 mL
AB	0,2 mL	2 mL
3xGB	0,6 mL	3,3 mL
glycerol	-	1 mL
AP	20 µL	50 µL
TEMED	2 µL	6 µL

Tab. 3.1 Složení gelů pro SDS-PAGE.

3xGB – 3x gelový pufr (3 M Tris-HCl, 0,3% (w/v) SDS, pH 8,45); AB – směs akrylamidu a bisakrylamidu (48% (w/v) akrylamid, 1,5% (w/v) bisakrylamid); AP – 10% (w/v) peroxodisíran amonný.

Po zpolymerování zaostřovacího gelu byly naneseny 3 µL standardu (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) a takové objemy připravených vzorků, aby nanesený protein činil 20 µg. Nakonec byla kompletně sestavena aparatura, doplněn katodový (100 mM Tris-HCl, 100 mM Tricin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,25) a anodový pufr (100 mM Tris-HCl, pH 8,9) a zahájena separace při 45 V. Jakmile proteiny dosáhly separačního gelu, napětí bylo zvýšeno na 90 – 100 V. Použitý protokol využívá systém Tricin-SDS, přičemž Tricin slouží jako vlečný ion. Tento systém umožňuje velmi dobrou separaci proteinů i o nižší molekulové hmotnosti (86).

3.8.3 Elektrotransfer na PVDF membránu

Aby mohla následovat imunodetekce proteinů, byl proveden přenos proteinů z gelu na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu (Immobilon-P, Millipore) v elektrickém poli mezi dvěma horizontálními grafitovými elektrodami (tzv. polosuchý elektrotransfer). Pro lepší přenos byl použit diskontinuální blotovací roztok (pufr I/anodový pufr I: 0,3 M Tris, 10% (v/v) methanol, pH 10,4; pufr II/anodový pufr II: 25 mM Tris, 10% (v/v) methanol, pH 9,0; pufr III/katodový pufr: 38 mM Tris, 10 mM glycín, 10% (v/v) methanol, pH 8,5).

Gel byl po ukončení elektroforézy 15 min ekvilibrován v pufru II. Mezitím byla připravena PVDF membrána (na 2 gely 10 × 12 cm). Nejprve byla aktivována ve 100% methanolu (cca 15 s), následně inkubována 2 min v deionizované vodě a poté 5 min v pufru II. Na zvlhčenou anodu byly pak postupně umístěny jednotlivé vrstvy – 6× filtrační papír

(Whatman 3 MM chromatography paper) ekvilibrovaný 30 s v pufru I, 3× filtrační papír ekvilibrovaný 30 s v pufru II, PVDF membrána, gel a 6× filtrační papír ekvilibrovaný 30 s v pufru III. Vzduchové bubliny mezi vrstvami byly vytlačeny opatrným válením zkumavky a nakonec byla přiklopena katoda. Všechny filtrační papíry měli stejnou velikost jako PVDF membrána. Elektrotransfer probíhal 1 hodinu při konstantním proudu 0,8 mA.cm⁻². Sandwich byl poskládán tak, že v elektrickém poli migrují záporně nabitě proteiny k anodě a váží se na PVDF membránu.

3.8.4 Imunodetekce na PVDF membráně

Proteiny přenesené na PVDF membránu mohou být detekovány specifickými primárními protilátkami. Komplexy proteinů a specifických primárních protilátek jsou následně zobrazeny sekundárními protilátkami značenými fluorescenčně či konjugovanými s křenovou peroxidasou, která po dodání substrátu katalyzuje chemiluminiscenční reakci.

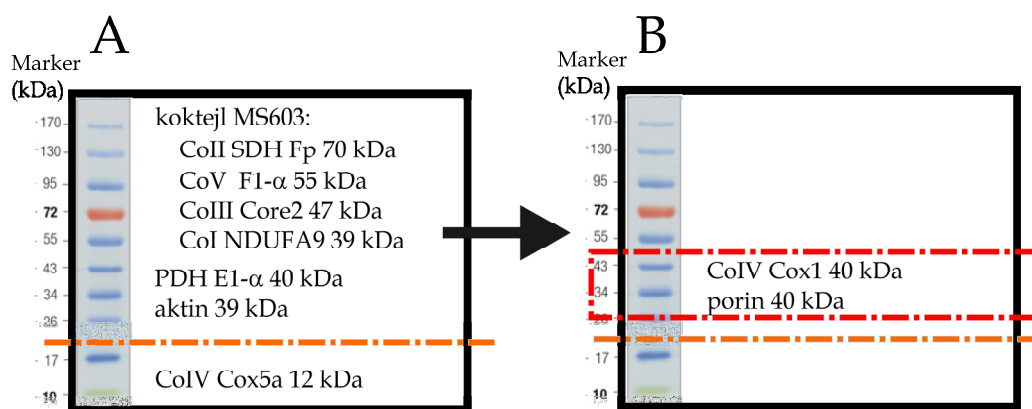
Membrána byla ekvilibrována 5 min v TBS (150 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7,5) a následně byla volná vazebná místa na membráně blokována 1 hod v 10% (w/v) nízkotučném sušeném mléku rozpuštěném v TBS. Zbytky mléka byly z membrány opláchnuty kýváním v 0,1% TBST (TBS s 0,1% (v/v) detergentem Tween-20) 4 × 3 min. Potom byla membrána přes noc při 4 °C nebo 2 hod při pokojové teplotě inkubována s primární protilátkou (použité protilátky a jejich ředění viz Obr. 3.9). Po inkubaci byla membrána odmývána 4 × 3 min v TBST, čímž se odstraní nespecificky navázané protilátky. Dále byla membrána inkubována 45 min s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou Alexa Fluor 680 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) naředěnou 1:3000 v TBST (cca 3 µL protilátky v 10 mL TBST), odmývána 4 × 3 min v TBST a poté byl detekován signál pomocí fluorescenčního skeneru Odyssey (fluorescenční značka Alexa Fluor 680 má excitační vlnovou délku 680 nm a emisní 700 nm).

Téměř všechny použité primární protilátky byly myší, výjimkou byla králičí primární protilátka proti porinu. V tomto případě byla použita sekundární protilátka IRDye 800 goat anti-rabbit IgG naředěná 1:3000 v TBST (fluorescenční značka IRDye 800 má excitační vlnovou délku 778 nm a emisní 795 nm).

Pouze v případě primární protilátky proti aktinu byla použita sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (ředěna 1:5000 v TBST). Pro zobrazení signálu byla membrána ošetřena ECL kitem (reagens 1 a 2 smíchána v poměru 1:1), který poskytuje

substrát pro peroxidasovou reakci. Membrána byla vložena do vyvolávacích desek a exponována na film po dobu 10 – 20 s (dle intenzity signálu, v případě přesvícení opakování s kratší dobou expozice). Film byl poté upevněn do vyvolávacího rámu a vyvolán – inkubován 1 min ve vývojce, omyt vodou, 30 s ponechán v ustalovači a nakonec opět důkladně omyt. Po oschnutí byl naskenován (Epson Perfection V700 Photo scanner). Všechny signály byly kvantifikovány pomocí softwaru *Aida Image Analyzer* (raytest Isotopenmessgeraete GmbH, Německo).

Při analýze kontrolních a *SURF1*^{-/-} myších fibroblastů byl využit jako marker buněčný aktin a jako markery mitochondriální porin a podjednotka pyruvát dehydrogenasy E1- α . Molekulová hmotnost všech uvedených proteinů se pohybuje okolo 40 kDa, v gelu tedy migrují velmi podobně, a proto byl postup detekce jednotlivých proteinů na membráně optimalizován tak, aby nedocházelo k interferenci jednotlivých detekovaných signálů (Obr. 3.9).



Obr. 3.9 Aplikace primárních protilátek při analýze kontrolních a *SURF1*^{-/-} myších fibroblastů.

(A) Membrána rozříznuta na 2 části. Při 4 °C přes noc část s proteiny o nízké molekulové hmotnosti inkubována s primární protilátkou specifickou proti Cox5a (Mitosciences, MS409, ředění 1:500 v TBST), druhá část s koktejlem protilátek MS603 (Mitosciences, 1:250) a následující den s primárními protilátkami proti podjednotce pyruvát dehydrogenasy E1- α (Mitosciences, MSP07, 1:1000) a poté proti aktinu (Calbiochem, 1:6000) vždy 2 hod při pokojové teplotě. Obě části membrány inkubovány společně 45 min v sekundární protilátce Alexa Fluor 680 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, 1:3000). Fluorescenční signály zaznamenány pomocí skeneru Odyssey. Poté příslušná část membrány inkubována 45 min se sekundární aktinovou protilátkou (Calbiochem, 1:5000), nakonec vyvolání na film. (B) Červeně označený výřez membrány ostripován, přes noc při 4 °C inkubován s primární myší protilátkou proti Cox1 (Mitosciences, MS404, 1:500), další den 2 hod při pokojové teplotě s primární králičí protilátkou proti porinu (1:1000) a následně se směsí sekundárních protilátek Alexa Fluor 680 goat anti-mouse (Molecular Probes, fluorescenční signál detekován při 700 nm) a IRDye 800 goat anti-rabbit (Rockland, fluorescenční signál detekován při 800 nm), přičemž obě byly naředěny v TBST 1:3000.

3.8.5 Opakované použití PVDF membrány

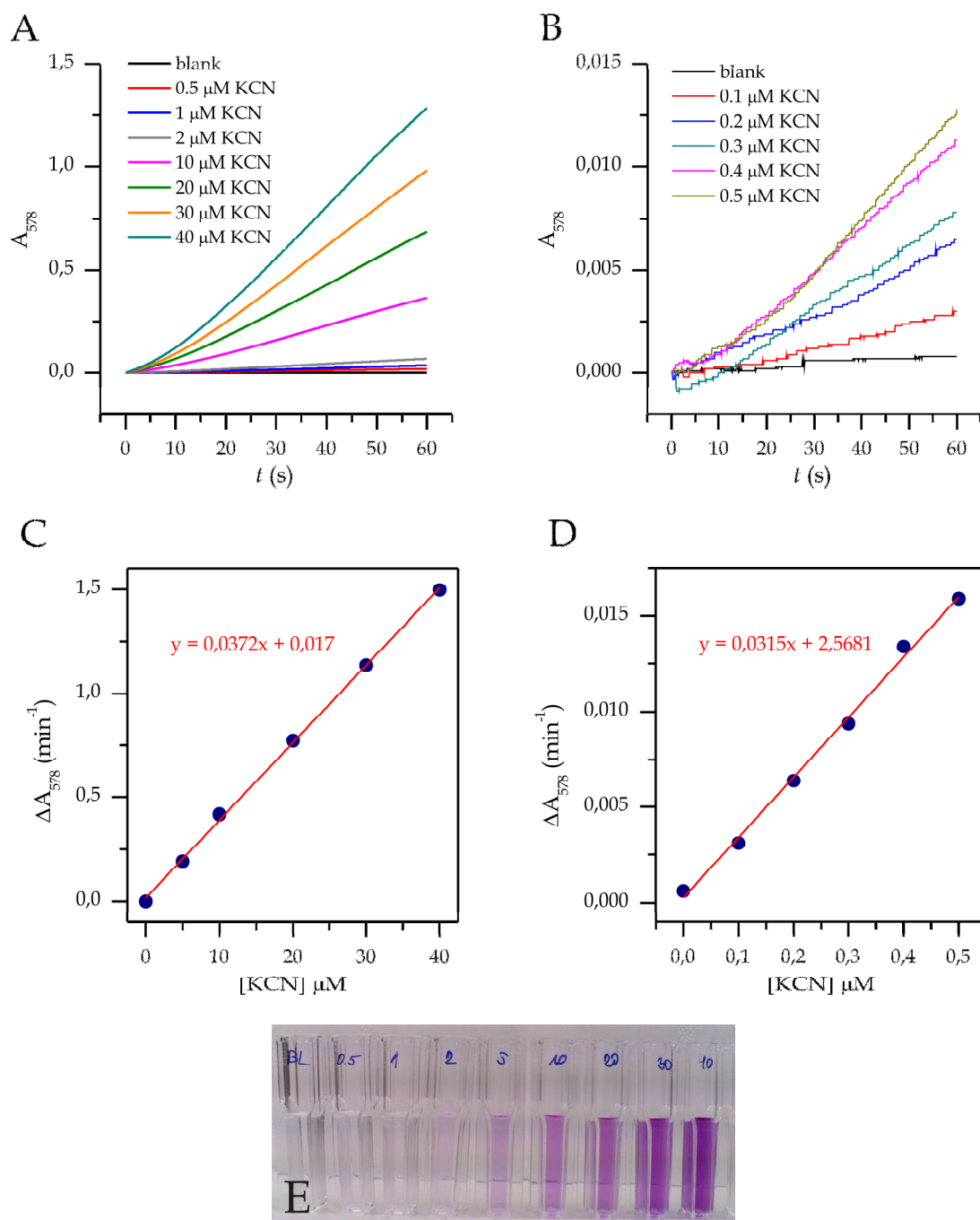
Ostripování („stripping“) PVDF membrány slouží k odstranění navázaných protilátek, pokud je následně potřeba detekovat protein, který má podobnou velikost jako protein již detekovaný a mohlo by dojít k překrytí signálů. Byl použit stripovací roztok o složení 6 M guanidinhydrochlorid, 0,2% Triton X-100, 100 mM 2-merkaptoethanol, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, jež umožňuje účinné a rychlé uvolnění specificky navázaných protilátek, aniž by došlo ke ztrátě proteinů přenesených na membránu (87). PVDF membrána byla inkubována při pokojové teplotě ve stripovacím roztoku 2×5 min při mírném kývání a poté oplachována kýváním v TBST 4×3 min.

3.9 Stanovení koncentrace volného KCN v inkubačním médiu

Stanovení koncentrace volného KCN v médiu, jež popsal Afkhami et al. (88), je v principu založeno na modifikované Königově reakci. V kyselém prostředí při 30 °C je kyanidový anion CN^- konvertován chloraminem T na chlorkyan (CNCl), jenž reaguje s pyridinem. Jeden z produktů této reakce kondenzuje s kyselinou barbiturovou za vzniku konečného barevného produktu.

Publikovaný protokol bylo nutné přizpůsobit menším objemům a zjistit detekční limit reakce. 750 μL vzorku bylo 3 min preinkubováno se 100 μL 0,2 M acetátového pufru (0,2 M kyselina octová a 0,2 M octan sodný smíchány tak, aby výsledný roztok měl pH 4) a 50 μL 0,5% (w/v) chloraminu T. Následně bylo přidáno 100 μL premixu obsahujícího 0,15 M kyselinu barbiturovou a 10% (v/v) pyridin. Výsledný objem tedy byl 1 mL a v souladu s výše zmíněnou publikací (88) byla konečná koncentrace acetátového pufru 20 mM, chloraminu T 0,025% (w/v), pyridinu 1% (v/v) a kyseliny barbiturové 15 mM. Vznik konečného barevného produktu byl sledován jako vzrůst absorbance při 578 nm na spektrofotometru Shimadzu UV-1601 (Obr. 3.10) a kinetika reakce byla analyzována v rozmezí 35 – 45 s po přidání premixu. Výstupním bodem měření tedy byla aktivita ($\Delta A_{578} \cdot \text{min}^{-1}$).

Lineárnost závislosti aktivity na koncentraci KCN byla opakovaně potvrzena v rozmezí 0 – 40 μM KCN a detekční limit byl stanoven 0,1 μM KCN (Obr. 3.10). Při detekci zbytkových koncentrací KCN v inkubačním médiu byla kalibrace prováděna v rozmezí koncentrací 0 – 2 μM . K přípravě standardů sloužil navážený KCN rozpuštěný v H_2O na výslednou koncentraci 0,5 mM.



Obr. 3.10 Kalibrace pro spektrofotometrické stanovení [KCN] v inkubačním médiu.

Nárůst absorbance standardů měřený při 578 nm v koncentračním rozmezí 0 – 40 μM (A) a 0 – 0,5 μM KCN (B). (C) a (D) ukazují příslušné kalibrační přímky. (E) Standardy – různá intenzita zabarvení odpovídá různým koncentracím KCN.

3.10 Spektrofotometrické stanovení enzymových aktivit

3.10.1 Cytochrom *c* oxidasa

Aktivita COX ve fibroblastech byla měřena jako lineární pokles absorbance při 550 nm v důsledku oxidace redukováného cyt *c* (spektrofotometr Shimadzu UV-1601) a vyjádřena v nmol cyt *c*.min⁻¹.mg proteinu⁻¹ dle Lambert-Beerova zákona s využitím molárního absorpčního koeficientu pro cyt *c* $\epsilon_{550} = 19,6 \times 10^6 \text{ cm}^2.\text{mol}^{-1}$. Stanovení enzymové aktivity bylo provedeno v PS kyvetě v konečném objemu 1 mL při 30 °C.

V prvním kroku byl vzorek (0,02 – 0,03 mg.mL⁻¹) solubilizován inkubací (1 min) s laurylmaltosidem (LM, 30 mg.mg proteinu⁻¹). Poté byla přidána H₂O (do celkového objemu 1 mL), 40 mM K-fosfátový pufr (pH 7,0) a 0,1 % (w/v) BSA a směs byla důkladně promíchána. Reakce byla spuštěna přidáním 25 μ M redukováného cyt *c*.

3.10.1.1 Příprava redukováného cytochromu *c*

Redukce cyt *c* dithioničitanem sodným a jeho následné přečištění od dithioničitanu na sephadexové koloně byly provedeny v chladové místnosti (7 °C).

Sephadex G-25 byl resuspendován v destilované vodě zahřáté na 60 – 90 °C a ponechán 30 min bobtnat. Pak byl několikrát dekantován studenou destilovanou vodou a převeden do 10 mM K-fosfátového pufru o pH 7,4 (KPi). Následně byla navrstvena kolona.

Ve zkumavce (15 mL) bylo rozpuštěno přibližně 0,25 g cyt *c* v 1 mL vychlazeného KPi. Cyt *c* byl ve tmě (ve zkumavce zakryté alobalem) na ledu inkubován s dithioničitanem sodným (množství přibližně na špičku kopistky) cca 5 min. Redukovaný cyt *c* byl navrstven pipetou na kolonu a eluován KPi. Jímaná frakce s cyt *c* byla rozdělena na alikvóty, které byly skladovány v – 80 °C.

Vždy před použitím bylo nutné stanovit koncentraci cyt *c*. Stanovení se provádí spektrofotometricky s využitím molárního absorpčního koeficientu $\epsilon_{550} = 19,6 \times 10^6 \text{ cm}^2.\text{mol}^{-1}$

dle vzorce $c = \frac{A_{red} - A_{ox}}{19,6} [mM]$, kde A_{red} představuje absorbanci redukováného cyt *c* a A_{ox}

absorbanci stejného objemu cyt *c* oxidovaného ferrikyanidem (hexakynoželezitanem) draselným. Lze rovněž určit procento redukce, pokud změříme absorbanci cyt *c* po dalším přidání dithioničitanu sodného.

3.10.2 Citrát synthasa

Citrát synthasa (CS) katalyzuje přenos acetylové skupiny z acetyl-CoA na oxalacetát za vzniku citrátu. S thioskupinou CoA pak reaguje Ellmanovo činidlo, tj. kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová (DTNB). Lineární nárůst absorpance vznikajícího produktu je sledován při 412 nm (spektrofotometr Shimadzu UV-1601). Aktivita CS je určena takto nepřímou, přičemž je nutné odečíst pozadí způsobené přítomností jiných thioskupin před přidáním oxalacetátu, tj. substrátu reakce, a vyjádřena v $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteinu}^{-1}$ dle Lambert-Beerova zákona s využitím molárního absorpčního koeficientu $\epsilon_{412} = 13,6 \times 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$.

Stanovení aktivity CS bylo provedeno v PS kyvetě v celkovém objemu 1 mL při 37 °C. V prvním kroku byly buňky ($0,02 - 0,03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) solubilizovány inkubací (1 min) s LM ($30 \text{ mg} \cdot \text{mg} \text{ proteinu}^{-1}$), poté byla přidána voda (do celkového objemu 1 mL) a 0,1 mM DTNB a směs byla promíchána. Přidáním 0,1 mM acetyl-CoA byla spuštěna reakce thioskupin přítomných ve vzorku s DTNB (pozadí). Přibližně po 30 s byl přidán 0,5 mM oxalacetát a byla sledována specifická aktivita CS, od které byla následně odečtena aktivita pozadí.

3.10.3 Sukcinát:cytochrom *c* oxidoreduktasa

Segment dýchacího řetězce se sukcinát:cytochrom *c* oxidoreduktasovou aktivitou (SCCR) zahrnuje transport elektronů z CoII přes CoIII na cyt *c*. Jelikož je v rámci stanovení enzymové aktivity akceptor elektronů z cyt *c* COX inhibována kyanidem, redukovaný cyt *c* se hromadí, a SCCR aktivitu lze tedy spektrofotometricky měřit jako nárůst absorpance při 550 nm a následně ji vyjádřit v $\text{nmol} \text{ cyt } c \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteinu}^{-1}$ podobně jako v případě aktivity COX ($\epsilon_{550} = 19,6 \times 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$), kdy však naopak redukovaný cyt *c* ubývá.

Aktivita byla měřena v PS kyvetě v objemu 1 mL při 30 °C. Vzorek ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) byl nejdříve 1 min inkubován v takovém množství H_2O , aby výsledný objem činil 1 mL. Hypotonická lyze buněk, k níž v H_2O dochází, umožňuje přístup substrátů k enzymům. Poté byl do kyvety přidán premix tak, že výsledné koncentrace jednotlivých komponent byly 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,1% (w/v) BSA a 1 mM KCN. Po přidání 50 μM oxidovaného cyt *c* byla směs promíchána a přidáním 10 mM sukcinátu byla spuštěna reakce.

3.10 Statistika

Data byla statisticky analyzována v programu *Origin 8.0 Pro* a vyjádřena jako průměr \pm SE (střední chyba průměru). Statistická významnost rozdílů hodnot mezi dvěma skupinami (např. mezi kontrolními a *SURF1*^{-/-} buňkami) byla stanovena dvouvýběrovým *t*-testem, k vyhodnocení rozdílů mezi více skupinami byl použit test ANOVA. Dosažená hladina testu (*p*-hodnota) je vyznačena v grafech (* *p* < 0,05, ** *p* < 0,01).

4 Výsledky

Část 1.

Cytochrom *c* oxidasa:

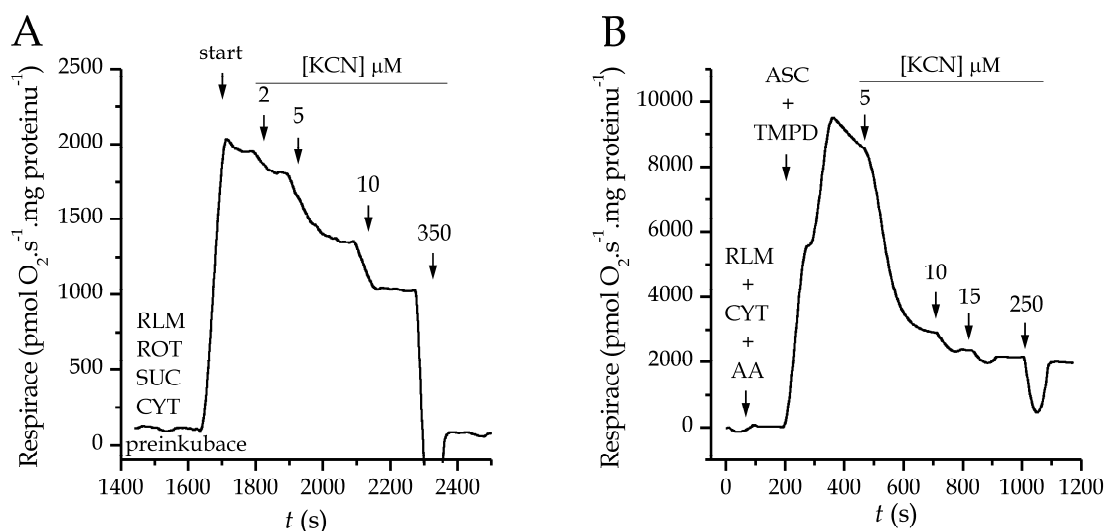
inhibice kyanidem a pyruvátem indukovaná obnova aktivity

4.1.1 Vliv kyanidu na elektrontransportní funkci COX

4.1.1.1 Inhibice respirace

Respirace izolovaných mitochondrií z jater potkana byla sledována se dvěma typy substrátů dýchacího řetězce – s askorbátem + TMPD a se sukcinátem. TMPD zajišťuje přímý přenos elektronů z externího donoru (askorbátu) na COX, kdežto elektrony ze sukcinátu jsou transportovány na COX přes redoxní komponenty dýchacího řetězce (Obr. 3.2). Proto rychlost respirace s askorbátem + TMPD odráží maximální využitelnou kapacitu COX za daných podmínek, zatímco respirace se sukcinátem umožňuje analyzovat aktivitu COX zásobované elektrony z dýchacího řetězce, konkrétně ze sukcinát dehydrogenasy (CoII).

V rámci osvojení si práce na oxygrafu byla měření provedena nejprve se zamraženými (Obr. 4.1) a až poté s čerstvě izolovanými intaktními mitochondriemi. V případě zamražených mitochondrií velmi dlouho trvalo, než respirace se sukcinátem dosáhla maximální a stabilní rychlosti, proto byly mitochondrie preinkubovány v otevřené komůrce oxygrafu s cyt *c*, rotenonem a sukcinátem a teprve po uplynutí 20 min bylo započato měření (Obr. 4.1A). Jelikož vnější mitochondriální membrána je poškozena zamražením a opětovným rozmražením, dochází k uvolnění cyt *c* do média, jehož

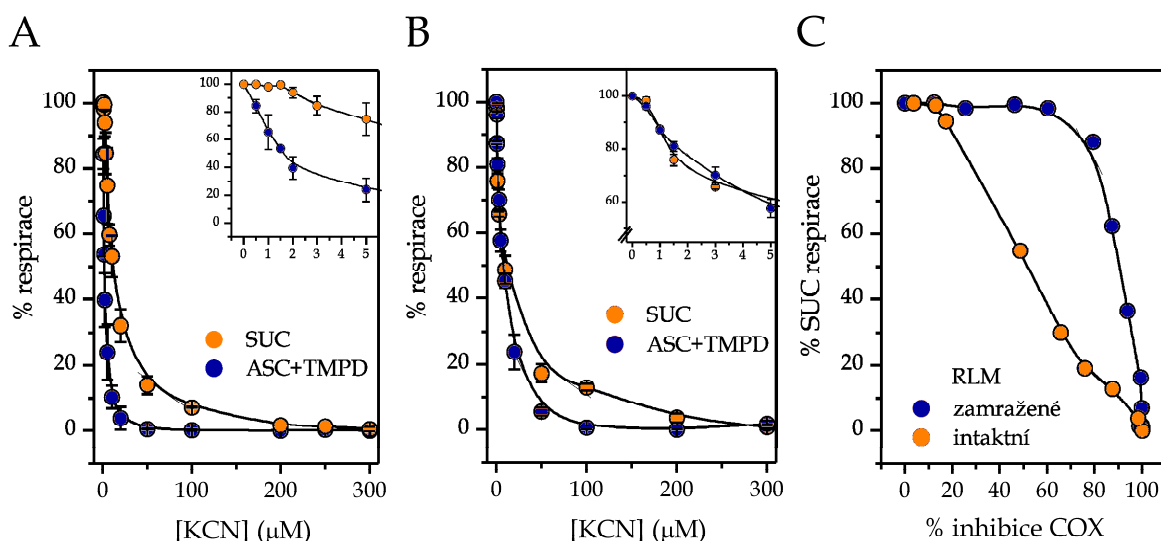


Obr. 4.1 Inhibiční účinek KCN na respiraci zamražených mitochondrií.

(A) Měření respirace se sukcinátem předcházela preinkubace mitochondrií (0,04 mg.mL⁻¹ mitochondriálního proteinu, RLM) s 1 μM rotenonem (ROT), 10 mM sukcinátem (SUC) a 25 μM cyt *c* (CYT) v otevřené komůrce oxygrafu. Po cca 20 min bylo měření zahájeno zavřením komůrky (start). Vyznačeny jsou přídatky KCN. (B) Respirace s askorbátem + TMPD byla měřena v přítomnosti mitochondrií (0,04 mg.mL⁻¹ mitochondriálního proteinu, RLM), 25 μM cyt *c* (CYT), 1 μg.mL⁻¹ antimycinu A (AA), 5 mM askorbátu (ASC), 1 mM TMPD a vzrůstající koncentrace KCN.

nedostatek by se tak stal faktorem limitujícím respiraci. Tomu bylo zabráněno přidáním poměrně vysoké koncentrace exogenního cyt *c*.

Zamražené mitochondrie vykazovaly při nižších koncentracích KCN značnou rezervní kapacitu COX (Obr. 4.2A), která je dobře pozorovatelná, zejména pokud jsou naměřená data vynesena jako „threshold plot“, tzn. podíl residuální respirace se sukcinátem v závislosti na podílu inhibice COX, tj. respirace s askorbátem + TMPD (Obr. 4.2C). Tento typ grafu umožňuje odečíst „threshold“ neboli prahovou hodnotu inhibice COX, za níž se již inhibice COX projeví výrazným snížením celkové respirace, zde se sukcinátem. Pro zamražené mitochondrie byla danou prahovou hodnotou přibližně 60% inhibice COX, což je ve shodě s publikovanými údaji (37). U respirace intaktních mitochondrií stimulované ADP (respirační stav 3) nadbytek COX nebyl téměř pozorován (Obr. 4.2B), a tedy ani prahová hodnota (Obr. 4.2C). Pouze v rozmezí koncentrací 20 – 200 μM KCN se projevila nižší citlivost respirace se sukcinátem vůči kyanidu. To je v souladu s kontrolními koeficienty



Obr. 4.2 Kyanidová inhibice respirace se sukcinátem a s askorbátem + TMPD.

(A) Respirace zamražených mitochondrií se sukcinátem (SUC) měřena v přítomnosti 0,06 – 0,10 mg.mL^{-1} mitochondriálního proteinu, 25 μM cyt *c*, 1 μM rotenonu a 10 mM sukcinátu; respirace s askorbátem + TMPD (ASC +TMPD) měřena v přítomnosti 0,03 – 0,05 mg.mL^{-1} mitochondriálního proteinu, 25 μM cyt *c*, 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ antimycinu A, 5 mM askorbátu a 1 mM TMPD. (B) ADP stimulovaná respirace (respirační stav 3) intaktních mitochondrií se sukcinátem (SUC) měřena v přítomnosti 0,09 – 0,15 mg.mL^{-1} mitochondriálního proteinu, 1 μM rotenonu, 10 mM sukcinátu a 1,5 mM ADP; ADP stimulovaná respirace (respirační stav 3) s askorbátem + TMPD (ASC+TMPD) byla měřena v přítomnosti 0,05 – 0,07 mg.mL^{-1} mitochondriálního proteinu, 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ antimycinu A, 5 mM askorbátu, 1 mM TMPD a 1,5 mM ADP. (C) „Threshold plot“. Naměřená data vynesena jako podíl residuální respirace se sukcinátem v závislosti na míře inhibice COX jak pro zamražené, tak pro intaktní mitochondrie (RLM). V (A) a (B) vložené grafy ukazují inhibici respirace při nízkých koncentracích KCN a jednotlivé body představují průměr \pm SE ($n = 3 - 5$).

naměřenými na stejném modelu se sukcinátem (89-91), ale v rozporu s poměrně vysokým thresholdem, který byl naměřen za víceméně stejných podmínek s výjimkou substrátu, kterým byl 10 mM pyruvát + 10 mM malát (35). Ovšem vezmeme-li v úvahu skutečnost, že pyruvát značně snižuje efektivní koncentraci kyanidu v médiu, skutečný threshold v daném experimentu by se nemusel lišit tak výrazně.

V experimentech s buňkami či izolovanými mitochondriemi se často k úplné inhibici dýchacího řetězce používá kyanid o koncentracích 250 – 330 μM (28, 76). I na daném modelu intaktních mitochondrií bylo potvrzeno, že 250 μM KCN je dostačující pro úplnou inhibici respirace jak se sukcinátem ($1541 \pm 90 \text{ pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg proteinu}^{-1}$), tak s askorbátem + TMPD ($2542 \pm 91 \text{ pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg proteinu}^{-1}$) (Obr. 4.2B). Tato koncentrace KCN byla aplikována ve všech dalších experimentech.

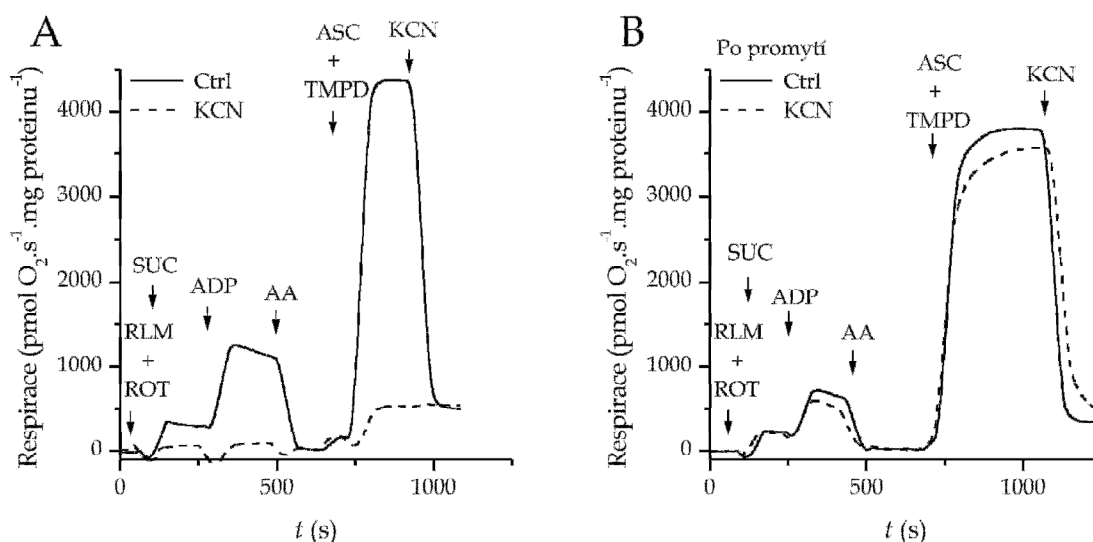
4.1.1.2 Reverzibilita inhibice respirace

V literatuře uváděná (38, 46, 77), nikoli však experimentálně doložená reverzibilita kyanidové inhibice COX byla prokázána promytím mitochondrií inkubačním médiem. Intaktní mitochondrie byly inkubovány v 15 mL média ($0,35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ mitochondriálního proteinu) po dobu 10 min s 250 μM KCN a následně dvakrát promyty médiem a centrifugovány (centrifuga Sigma 3K18, rotor Sigma #19777-H, 10000 g po dobu 10 min).

Před promytím, tedy v přítomnosti 250 μM KCN, nebyla na rozdíl od kontroly inkubované v médiu bez KCN detekována respirace se sukcinátem ani s askorbátem + TMPD (Obr. 4.3A). Po promytí se rychlosti obou typů respirace vrátily na úroveň kontrolních hodnot (Obr. 4.3B), což dokládá úplnou reverzibilitu kyanidové inhibice respirace v našich experimentálních podmínkách. Respirace obnovená promytím mitochondrií si navíc uchovala citlivost ke kyanidu, což bylo potvrzeno dalším přídatkem KCN (Obr. 4.3B).

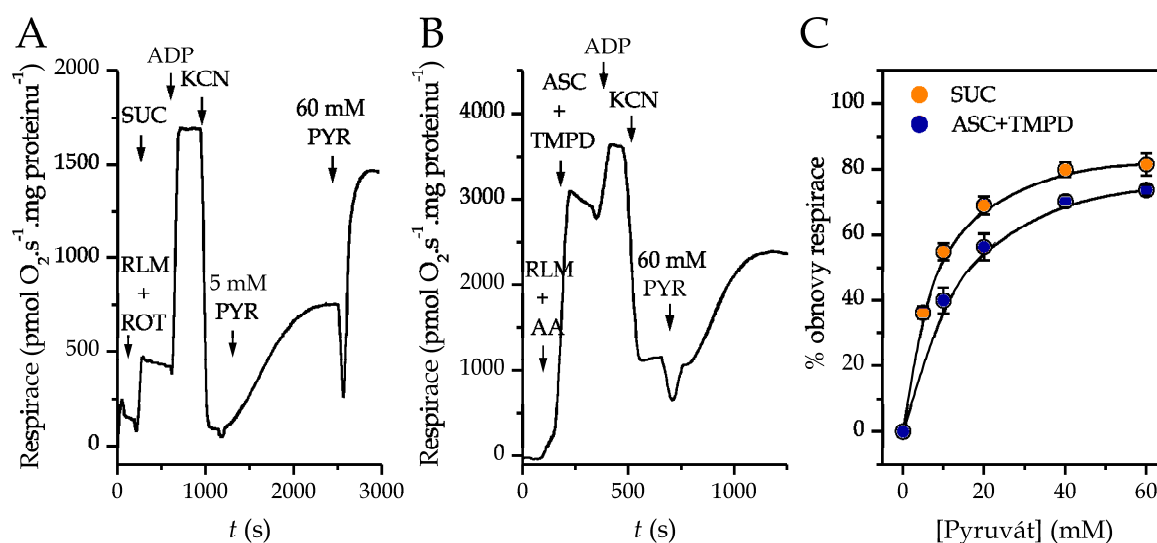
4.1.1.3 Obnova respirace pyruvátem

Aby mohla být vyhodnocena schopnost pyruvátu obnovit respiraci inhibovanou působením KCN, byl stanoven účinek zvyšující se koncentrace pyruvátu na rychlost respirace se sukcinátem a askorbátem + TMPD na intaktních mitochondriích v přítomnosti 250 μM KCN. Standardní postup měření je znázorněn na Obr. 4.4A a 4.4B. Maximální možné obnovy bylo dosaženo přidavkem 60 mM pyruvátu, kdy bylo obnoveno 80 % původní



Obr. 4.3 Reverzibilita kyanidové inhibice respirace.

Respirace intaktních mitochondrií ($0,6 - 0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ mitochondriálního proteinu, RLM) měřena v přítomnosti $1 \mu\text{M}$ rotenonu (ROT), 10 mM sukcinátu (SUC), $1,5 \text{ mM}$ ADP, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ antimycinu A (AA), 5 mM askorbátu (ASC), 1 mM TMPD a $250 \mu\text{M}$ KCN. (A) Měření provedeno po inkubaci mitochondrií v médiu v přítomnosti (KCN) či absenci (Ctrl) $250 \mu\text{M}$ KCN před promytím. (B) Mitochondrie inkubované s $250 \mu\text{M}$ KCN (KCN) nebo pouze s médiem (Ctrl) promyty a následně použity k měření respirace. Experiment byl třikrát opakován se stejným výsledkem.



Obr. 4.4 Pyruvátem indukovaná obnova respirace inhibované $250 \mu\text{M}$ KCN.

Obnova ADP stimulované respirace (respirační stav 3) intaktních mitochondrií měřena jako (A) respirace se sukcinátem v přítomnosti $0,09 \text{ mg.mL}^{-1}$ mitochondriálního proteinu (RLM), $1 \mu\text{M}$ rotenonu (ROT), 10 mM sukcinátu (SUC), $1,5 \text{ mM}$ ADP, $250 \mu\text{M}$ KCN a pyruvátu (5 mM a 60 mM PYR) a jako (B) respirace s askorbátem + TMPD v přítomnosti $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ mitochondriálního proteinu (RLM), $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ antimycinu A (AA), 5 mM askorbátu (ASC), 1 mM TMPD, $1,5 \text{ mM}$ ADP a 60 mM pyruvátu. (C) Dosažená obnova respirace se sukcinátem (SUC) a s askorbátem + TMPD (ASC+TMPD) v závislosti na koncentraci pyruvátu. Jednotlivé body představují průměr \pm SE ($n = 3 - 5$).

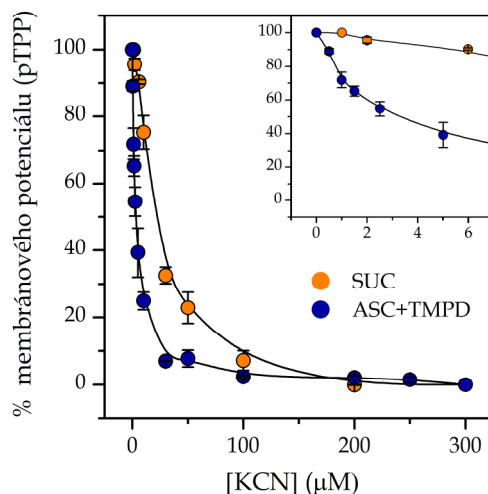
respirace se sukcinátem, resp. 70 % respirace s askorbátem + TMPD (Obr. 4.4C). Pyruvát o vyšších koncentracích nebyl účinnější.

4.1.2 Vliv kyanidu na protontransportní funkci COX

4.1.2.1 Pokles membránového potenciálu

Inhibice COX kyanidem nemá za následek pouze zablokování její elektrontransportní funkce, což se projeví jako pokles rychlosti respirace, ale dochází rovněž k zastavení pumpování protonů přes vnitřní mitochondriální membránu, a to jak samotnou COX, tak ostatními komplexy dýchacího řetězce, jelikož nedochází k transportu elektronů dýchacím řetězcem. Na úrovni COX byla inhibice kyanidem pozorována v respiračním stavu 4 (tj. bez stimulace respirace ADP) jako pokles membránového potenciálu generovaného s askorbátem + TMPD. Snížení membránového potenciálu generovaného přidáním sukcinátu pak odpovídá změně potenciálu tvořeného dvěma protonovými pumpami dýchacího řetězce (CoIII + CoIV) (Obr. 4.5).

Membránový potenciál generovaný askorbátem + TMPD (-140 ± 3 mV) představuje pouze jednu protonovou pumpu, COX, a dosahoval proto nižších hodnot než membránový



Obr. 4.5 Pokles membránového potenciálu způsobený kyanidem.

Inhibiční efekt kyanidu na mitochondriální membránový potenciál byl studován se sukcinátem (SUC) ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ mitochondriálního proteinu, $1 \mu\text{M}$ rotenon, 10 mM sukcinát) a s askorbátem + TMPD (ASC+TMPD) ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ mitochondriálního proteinu, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ antimycinu A, 5 mM askorbát, 1 mM TMPD). Data vyjádřena jako procentuální podíl maximálního mitochondriálního membránového potenciálu (pTPP) dosaženého po energizaci mitochondrií substráty. Vložený graf ukazuje pokles membránového potenciálu při nízkých koncentracích KCN. Jednotlivé body představují průměr \pm SE ($n = 3 - 5$).

potenciál generovaný sukcinátem (-171 ± 4 mV), který zahrnuje rovněž protonovou pumpu CoIII. Inhibiční efekt KCN na membránový potenciál byl podobný jako účinek na respiraci. Membránový potenciál generovaný askorbátem + TMPD byl citlivější k inhibici kyanidem, v obou případech však došlo k úplnému vyčerpání membránového potenciálu v přítomnosti 250 μ M KCN, tzn. hodnota membránového potenciálu se snížila na úroveň hodnoty naměřené po přidání rozpřahovače FCCP.

4.1.2.2 Reverzibilita efektu kyanidu na membránový potenciál

Stejně jako reverzibilita kyanidové inhibice respirace byla prokázána i reverzibilita působení kyanidu na membránový potenciál se sukcinátem. Mitochondrie byly inkubovány s 250 μ M KCN a poté dvakrát promyty inkubačním médiem (detailní postup viz kap. 4.1.1.2). Před promytím nebylo na těchto mitochondriích na rozdíl od kontrolních možné naměřit žádný potenciál, kdežto po promytí byly hodnoty potenciálu srovnatelné (Obr. 4.6).

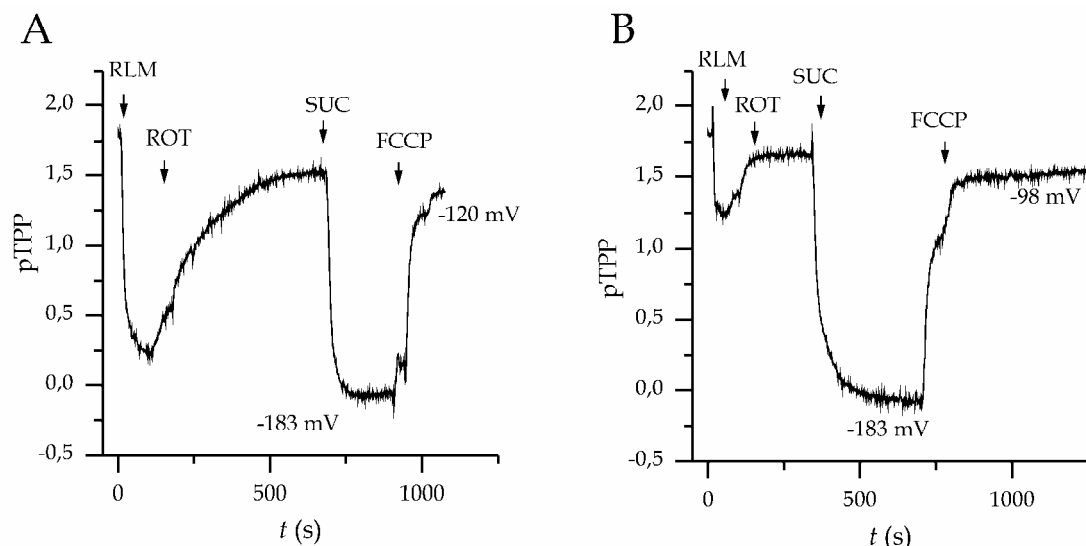
4.1.2.3 Obnova membránového potenciálu pyruvátem

Membránový potenciál v respiračním stavu 4 byl po vyčerpání v důsledku přidání 250 μ M KCN obnoven přídavkem pyruvátu (Obr. 4.7A). Maximální obnovy bylo stejně jako v případě respirace dosaženo 60 mM pyruvátem a vyšší koncentrace neměly další pozitivní efekt. Membránový potenciál generovaný sukcinátem byl obnoven z 80 %, membránový potenciál generovaný askorbátem + TMPD z 60 % (Obr. 4.7B). Respirace a membránový potenciál, čili elektrontransportní a protontransportní aktivita COX, jsou tedy podobně inhibovány kyanidem a obnoveny působením pyruvátu.

4.1.3 Vliv kyanidu na afinitu ke kyslíku

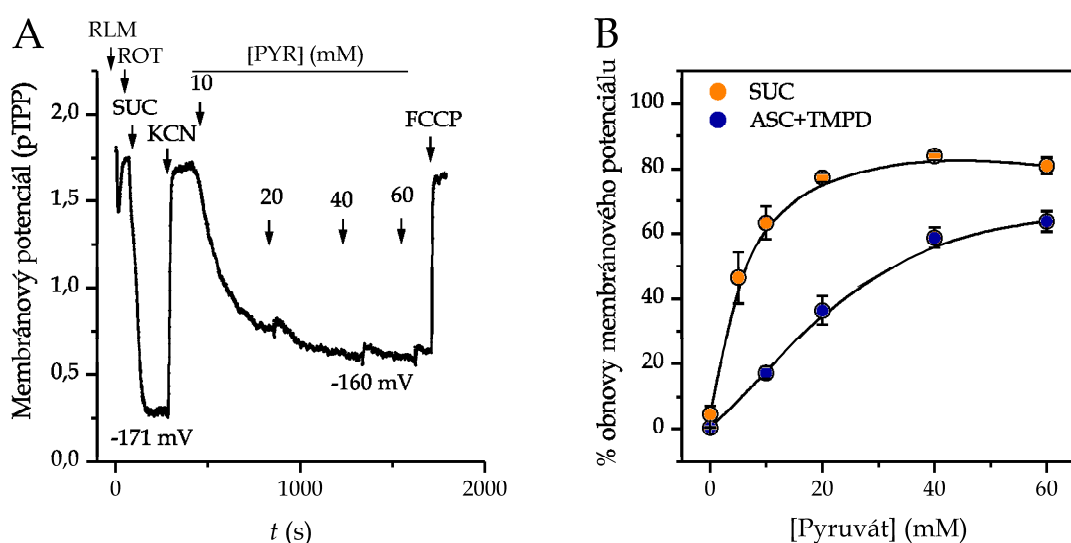
4.1.3.1 Snížení afinity ke kyslíku

Již při velmi nízkých koncentracích kyanidu byla výrazně snížena afinita ke kyslíku (Obr. 4.8A), která byla počítána jako reciproká hodnota p_{50} pro kyslík ($1/p_{50}$). Snížení afinity ke kyslíku znamená, že se zvyšuje p_{50} . 5 μ M KCN zvýšil p_{50} respirace se sukcinátem (v respiračním stavu 4, bez ADP stimulace) více než třicetkrát (z $0,021 \pm 0,002$ kPa na $0,701 \pm 0,084$ kPa). Určit hodnotu p_{50} v přítomnosti 250 μ M KCN však nebylo možné, protože residuální respirace se sukcinátem (cca 5%) byla pro výpočet příliš nízká.



Obr. 4.6 Reverzibilita efektu kyanidu na membránový potenciál.

Membránový potenciál se sukcinátem na kontrolních mitochondriích před promytím (A) a na mitochondriích inkubovaných s 250 μM KCN po promytí (B) měřen v přítomnosti 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ mitochondriálního proteinu (RLM), 1 μM rotenonu (ROT), 10 mM sukcinátu (SUC) a 1 μM FCCP. Experimenty dvakrát opakovány se stejným výsledkem.



Obr. 4.7 Obnova membránového potenciálu pyruvátem.

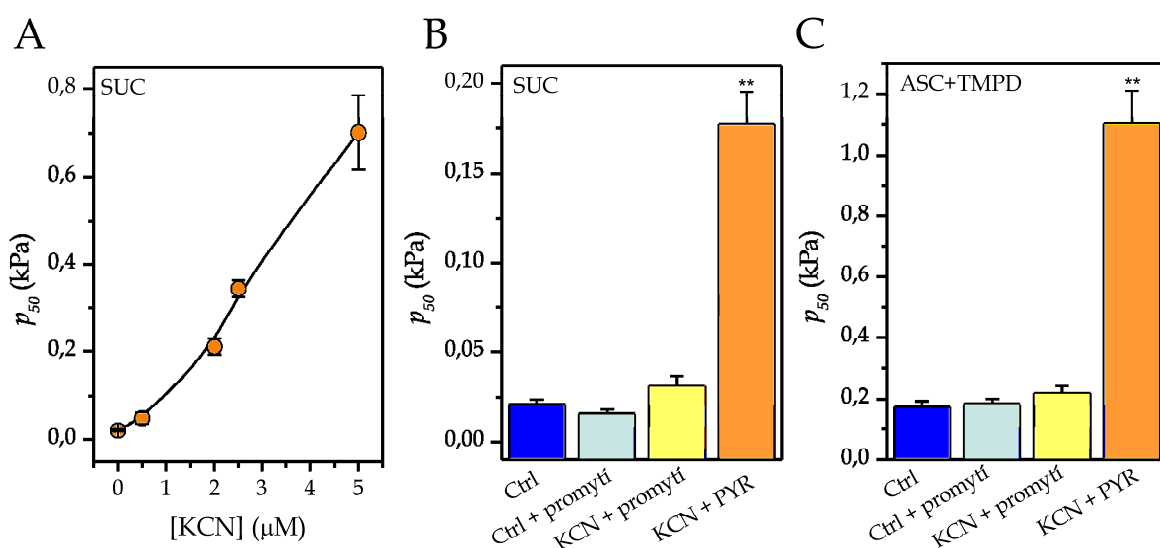
(A) Obnova mitochondriálního membránového potenciálu se sukcinátem po jeho vyčerpání v důsledku 250 μM KCN měřena v přítomnosti 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ mitochondriálního proteinu (RLM), 1 μM rotenonu (ROT), 10 mM sukcinátu (SUC), 250 μM KCN, pyruvátu daných koncentrací (PYR) a 1 μM FCCP. Membránový potenciál do grafu vynesena jako pTPP. (B) Dosažená obnova membránového potenciálu generovaného sukcinátem (SUC) a askorbátem + TMPD (ASC+TMPD) v závislosti na koncentraci přidaného pyruvátu. Data vyjádřena jako procentuální podíl maximálního mitochondriálního membránového potenciálu (pTPP) dosaženého po energizaci mitochondrií substráty. Jednotlivé body představují průměr \pm SE ($n = 3 - 5$).

4.1.3.2 Reverzibilita působení kyanidu na afinitu ke kyslíku

Nižší afinita ke kyslíku, tzn. vyšší hodnota p_{50} , je pozorována při vyšší rychlosti transportu elektronů dýchacím řetězcem, tedy při vyšší rychlosti respirace, což je případ respirace s askorbátem + TMPD. Proto je výrazný rozdíl (přibližně čtyřicetnásobný) v absolutní hodnotě p_{50} mezi respirací se sukcinátem a respirací s askorbátem + TMPD (Obr. 4.8). Již velmi nízké koncentrace KCN se projevily výrazným zvýšením p_{50} (Obr. 4.8A), nicméně po promytí mitochondrií inkubovaných s KCN bylo dosaženo původní hodnoty p_{50} bez rozdílu vzhledem ke kontrolním mitochondriím, a to jak u respirace se sukcinátem (Obr. 4.8B), tak s askorbátem + TMPD (Obr. 4.8C).

4.1.3.3 Obnova afinity ke kyslíku pyruvátem

Na rozdíl od promývání mitochondrií bylo po přidání 60 mM pyruvátu, což byla koncentrace, jež vykazovala nejlepší obnovu respirace a membránového potenciálu, dosaženo pouze částečné obnovy afinity ke kyslíku po inhibici 250 μ M KCN. Hodnoty p_{50}



Obr. 4.8 Změny afinity ke kyslíku.

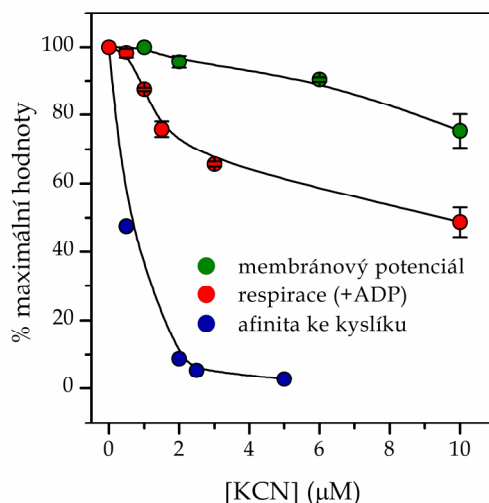
(A) Hodnota p_{50} respirace se sukcinátem počítána v přítomnosti nízkých koncentrací KCN. Hodnoty p_{50} (B) respirace se sukcinátem (0,25 – 0,30 mg.mL^{-1} mitochondriálního proteinu, 1 μ M rotenon, 10 mM sukcinát) a (C) respirace s askorbátem + TMPD (0,05 – 0,07 mg.mL^{-1} mitochondriálního proteinu, 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ antimycinu A, 5 mM askorbát, 1 mM TMPD) určeny v kontrolních mitochondriích před (Ctrl) a po promytí (Ctrl + promytí), v mitochondriích inkubovaných s 250 μ M po promytí (KCN + promytí) a v mitochondriích vystavených účinku 250 μ M KCN a 60 mM pyruvátu (KCN + PYR). Jednotlivé hodnoty představují průměr \pm SE ($n = 4 - 13$). V případě KCN + PYR je v porovnání s kontrolou (Ctrl) signifikantně zvýšena hodnota p_{50} jak u respirace se sukcinátem, tak s askorbátem + TMPD (** $p < 0,01$).

respirace se sukcinátem a s askorbátem + TMPD zůstaly po přidání pyruvátu zvýšeny 8,3krát (Obr. 4.8B), resp. 6,1krát (Obr. 4.8C).

4.1.4 Citlivost COX ke kyanidu

Při porovnání ADP-stimulované respirace v respiračním stavu 3 a mitochondriálního membránového potenciálu a afinity ke kyslíku v respiračním stavu 4 vykazují jednotlivé funkční parametry COX, jmenovitě transport elektronů, pumpování protonů a afinita ke kyslíku, rozdíly v citlivosti ke kyanidu (Obr. 4.9). Pro účely tohoto srovnání byl jako substrát dýchacího řetězce použit sukcinát, který vyhovuje fyziologickým podmínkám v buňce mnohem lépe než arteficiální elektronový donorový systém askorbát + TMPD, a proto umožňuje usuzovat na možné účinky KCN *in vivo*.

Je evidentní, že afinita ke kyslíku představuje funkční parametr COX nejcitlivější k působení kyanidu, zatímco pumpování protonů se jeví jako nejméně senzitivní. Např. 2 μM KCN způsobil desetinásobný pokles afinity ke kyslíku, kdežto membránový potenciál a respirace se snížily pouze o 5 %, resp. o 30 %.



Obr. 4.9 Citlivost COX k nízkým koncentracím KCN.

Tři funkční parametry COX byly porovnány vzhledem k jejich citlivosti k inhibici KCN. Určena byla inhibice elektrontransportní funkce (ADP-stimulovaná respirace se sukcinátem v respiračním stavu 3, červeně), protontransportní funkce (membránový potenciál generovaný sukcinátem v respiračním stavu 4, zeleně) a afinita ke kyslíku respirace se sukcinátem (v respiračním stavu 4, modře), která byla počítána jako $1/p_{50}$. V případě respirace a membránového potenciálu se jedná o průměr \pm SE ($n = 3 - 5$), hodnota afinity ke kyslíku je převrácená hodnota průměrného p_{50} .

4.1.5 Stanovení koncentrace volného kyanidu v inkubačním médiu

Všechny tři funkční parametry použité k analýze funkce COX (tj. respirace, mitochondriální membránový potenciál a p_{50} , resp. afinita ke kyslíku) byly ovlivněny KCN reverzibilním způsobem, jak bylo ukázáno na promytých mitochondriích, ale aktivita žádného z těchto parametrů nebyla obnovena na 100 % pyruvátem, i když koncentrace pyruvátu (60 mM) byla mnohem vyšší než koncentrace kyanidu (250 μ M). Možnou příčinou mohla být určitá residuální koncentrace kyanidu v inkubačním médiu a vázaná na COX, jelikož reakce kyanidu s pyruvátem probíhá velmi rychle v basickém pH (61), ale zřejmě ne v neutrálním inkubačním médiu (pH 7,3, podobně jako intracelulární pH).

Aby mohla být posouzena účinnost reakce kyanidu a pyruvátu, jejímž produktem je netoxický kyanohydrin, byla stanovena residuální koncentrace volného kyanidu v inkubačním médiu po provedeném měření na oxygrafu. Bylo zjištěno, že přidavek 60 mM pyruvátu snížil původní koncentraci 250 μ M KCN na 0.57 ± 0.29 μ M detekovatelného KCN ($n = 5$). Po promytí mitochondrií byla však residuální koncentrace KCN nižší než 0,2 μ M. Vzhledem k pozorovanému účinku KCN na všechny funkční parametry COX lze vyvodit, že taková koncentrace je už příliš nízká na to, aby způsobila jakýkoli signifikantní pokles aktivity COX v promytých mitochondriích.

4 Výsledky

Část 2.

Cytochrom *c* oxidasa:

defekt asemblačního faktoru Surf1

4.2.1 Snížený obsah a aktivita cytochrom c oxidasy

Metody osvojené v první části práce v experimentech s izolovanými mitochondriemi byly posléze využity v experimentech na kultivovaných buňkách s defektem proteinu Surf1. Nevýhoda buněčného modelu spočívá často v limitovaném množství dostupného materiálu, zatímco z jater potkana je vždy naizolován značný nadbytek mitochondrií. Výhodou buněčného modelu ovšem je, že obsahuje veškeré mitochondrie, kdežto při izolaci mitochondrií dochází k výrazným ztrátám a zůstává pouze určitá frakce. Dále jsou zachovány přirozené interakce mitochondrií s ostatními buněčnými strukturami, především cytoskeletem. Celkově je tedy buněčný model mnohem blíže podmínkám *in vivo* nežli izolované mitochondrie a jsou zachovány mitochondriální funkce v původním stavu (92).

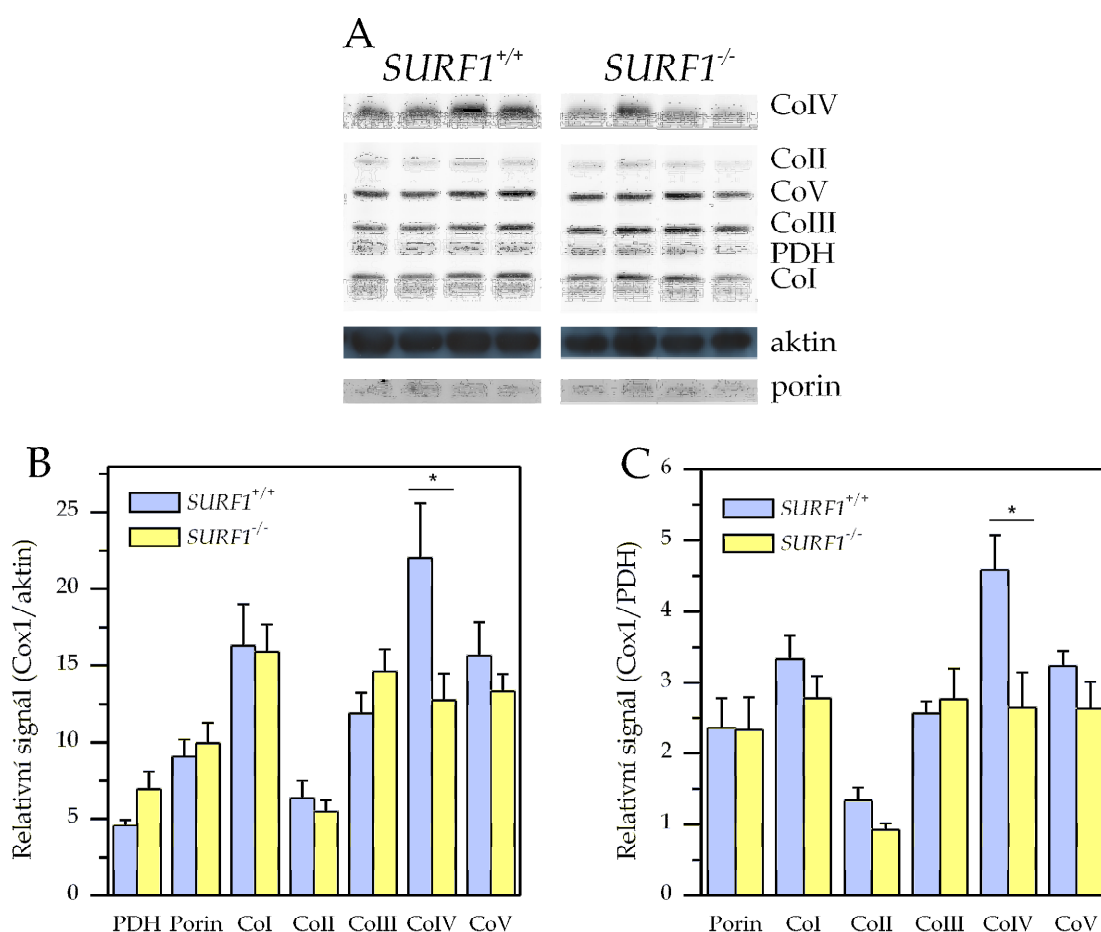
Model *SURF1*^{-/-} myši byl vytvořen s cílem porovnat funkční projevy deficience COX na základě absence funkčního proteinu Surf1 (79). Deficience Surf1 proteinu vede ke snížení účinnosti assemblace komplexu COX, a výsledkem tedy je snížené množství holoenzymu. Ve fibroblastech pacientů s mutací v *SURF1* genu bylo nalezeno výrazně snížené množství holoenzymu COX (15 % kontroly) a akumulace assemblačních intermediátů (28), jejichž množství bylo výrazně nižší ve tkáních *SURF1*^{-/-} myši (93).

	Aktivita <i>SURF1</i> ^{+/+} nmol.min ⁻¹ .mg proteinu ⁻¹	Aktivita <i>SURF1</i> ^{-/-} nmol.min ⁻¹ .mg proteinu ⁻¹	% aktivity <i>SURF1</i> ^{+/+}
COX	459,3 ± 33,6	248,3 ± 49,3 **	54,1
SCCR	22,43 ± 2,49	22,01 ± 2,62	98,1
CS	333,7 ± 15,3	280,3 ± 28,4	84,0
COX/CS	1,39 ± 0,11	0,87 ± 0,12 *	62,3
SCCR/CS	0,068 ± 0,010	0,078 ± 0,009	114,3

Tab. 4.1 Enzymové aktivity kontrolních a *SURF1*^{-/-} buněk.

Spektrofotometricky byly měřeny aktivity cytochrom c oxidasy (COX), sukcinát:cytochrom c oxidoreduktasy (SCCR) a citrát synthasy (CS) u zamražených kontrolních (*SURF1*^{+/+}) i *SURF1*^{-/-} buněk. Aktivity COX a SCCR byly rovněž normalizovány vzhledem k aktivitě CS. Poslední sloupec vyjadřuje aktivitu enzymu u *SURF1*^{-/-} buněk ve srovnání s kontrolou. Jednotlivé hodnoty představují průměr ± SE (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *SURF1*^{+/+} $n = 7$, *SURF1*^{-/-} $n = 6$, vzorky měřeny v duplikátech).

Obsah COX v imortalizovaných myších fibroblastech stejně jako dalších komplexů dýchacího řetězce byl analyzován pomocí SDS-PAGE a WB (Obr. 4.10A). Signály specifických protilátek byly vyhodnoceny a normalizovány vzhledem k signálu jednak buněčného markeru aktinu (Obr. 4.10B), jednak mitochondriálního markeru, jako který sloužil matrixový enzym pyruvát dehydrogenasa (PDH) (Obr. 4.10C). V obou případech byl zjištěn signifikantní pokles obsahu COX v *SURF1*^{-/-} buňkách, a to na 58 % kontrolních hodnot. Podobné (na 54 %) bylo snížení aktivity COX měřené spektrofotometricky (Tab. 4.1), zatímco aktivita SCCR, tj. spřažená aktivita segmentu dýchacího řetězce CoII + CoIII, dosahovala kontrolních hodnot. Aktivita citrát synthasy (CS), enzymu Krebsova cyklu, byla



Obr. 4.10 SDS-PAGE a WB analýza obsahu mitochondriálních proteinů kontrolních a *SURF1*^{-/-} buněk.

(A) Na SDS-PAGE nanese 20 μ g vzorku. Na WB proteiny detekovány specifickými protilátkami proti aktinu (buněčný marker), E1- α podjednotce pyruvát dehydrogenasy (PDH) a porinu (mitochondriální markery) a proti podjednotkám jednotlivých komplexů dýchacího řetězce (NDUFA9 CoI, jejíž signál byl rozpadlý na 2 proužky, SDH70 CoII, Core 2 CoIII, Cox1 CoIV, F1- α CoV). Porovnání signálů protilátek normalizovaných na signál aktinu (B) a PDH (C) ukázalo signifikantně snížený obsah CoIV (COX) v *SURF1*^{-/-} buňkách. Jednotlivé body představují průměr \pm SE (* $p < 0,05$, *SURF1*^{+/+} $n = 14$, *SURF1*^{-/-} $n = 22$, každý vzorek analyzován dvakrát).

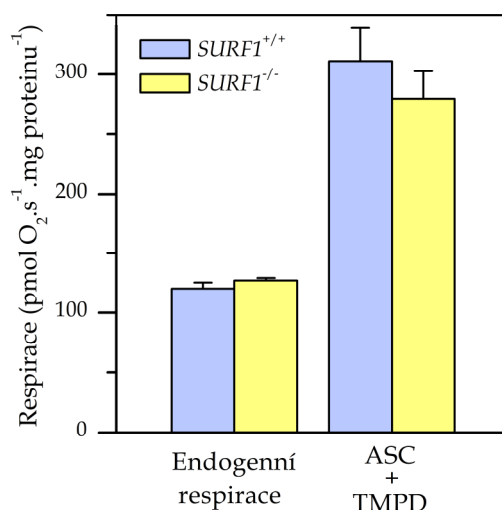
mírně snížena na 84 %. Pokud jsou aktivity COX a SCCR vztaženy na aktivitu CS jako mitochondriálního markeru, pak normalizovaná aktivita COX (COX/CS) je u *SURF1*^{-/-} buněk sigifikantně snížena na 62 % a normalizovaná aktivita SCCR nevykazuje signifikantní rozdíl mezi oběma typy buněk.

4.2.2 Vliv defektu Surf1 na rychlost respirace

Porovnání endogenní respirace intaktních buněk v kultivačním médiu DMEM ($120,2 \pm 5,1$ pmol O₂.s⁻¹.mg proteinu⁻¹ u kontrolních buněk, $126,8 \pm 2,3$ pmol O₂.s⁻¹.mg proteinu⁻¹ u *SURF1*^{-/-} buněk), z něhož získávají glukosu jako hlavní zdroj energie, neukázalo žádný rozdíl stejně jako srovnání rychlosti respirace buněk permeabilizovaných digitoninem s arteficielním donorem elektronů pro COX, tj. askorbátem + TMPD ($311,0 \pm 27,7$ pmol O₂.s⁻¹.mg proteinu⁻¹ u kontrolních a $279,5 \pm 22,9$ pmol O₂.s⁻¹.mg proteinu⁻¹ u *SURF1*^{-/-} buněk) (Obr. 4.11).

4.2.3 Vliv defektu Surf1 na membránový potenciál

Změny membránového potenciálu sledující sekvenci přidavků substrátů a inhibitorů (Obr. 4.12A, 4.12B) byly využity k výpočtu poměru $pTPP_{AT}/pTPP_{GMS}$, který vyjadřuje, jak vysokého potenciálu dosáhne samotná protonová pumpa COX poháněná arteficielním

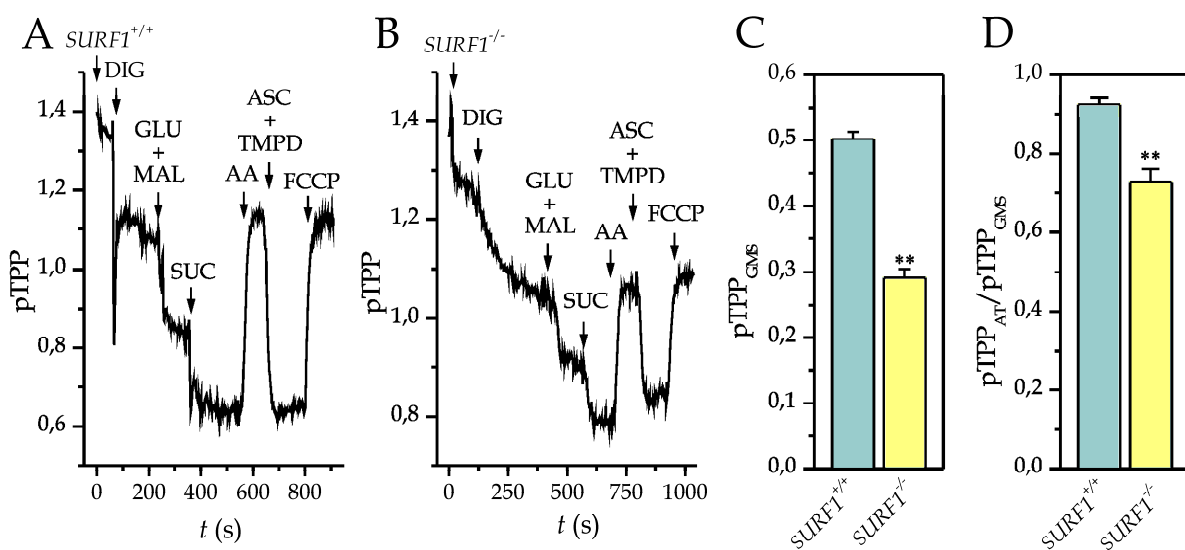


Obr. 4.11 Vliv defektu Surf1 proteinu na rychost respirace.

*Porovnána byla endogenní respirace intaktních buněk kontrolních (*SURF1*^{+/+}) a s defektem (*SURF1*^{-/-}) v kultivačním médiu a buněk permeabilizovaných digitoninem (20 µg.mg proteinu⁻¹) se substráty askorbátem (2 mM) a TMPD (0,6 mM) (ASC+TMPD). Jednotlivé body představují průměr ± SE (n = 7 – 9).*

elektronovým donorem askorbátem + TMPD v porovnání s membránovým potenciálem dosaženým při plné energizaci buněk kombinací substrátů glutamát + malát (pro CoI) a sukcinát (pro CoII), kdy jsou funkční všechny tři protonové pumpy dýchacího řetězce (CoI, CoIII a CoIV).

Při porovnání hodnot pTPP je za nulovou považována hodnota pTPP po přidání rozpráhovače FCCP. Porovnáván je pak rozdíl pTPP v určitém stavu a hodnoty pTPP po přidání FCCP (např. pTPP_{GMS}). Kontrolní buňky dosahovaly pTPP_{GMS} o hodnotě $0,50 \pm 0,01$, zatímco u *SURF1*^{-/-} buněk byl tento parametr signifikantně snížen na $0,29 \pm 0,01$ (Obr. 4.12C). Bez normalizace na objem mitochondrií, který se může mezi oběma typy buněk výrazně lišit, nelze však data hodnotit kvantitativně, nýbrž pouze relativně. Poměr pTPP_{AT}/pTPP_{GMS}, který ukazuje, do jaké míry je COX schopná navodit maximální membránový potenciál ze stavu při plné energizaci, odhalil sníženou protontransportní aktivitu COX u *SURF1*^{-/-} buněk (Obr. 4.12D). COX kontrolních buněk dosáhla 92 % maximálního potenciálu, kdežto u *SURF1*^{-/-} buněk bylo s askorbátem + TMPD dosaženo pouhých 73 %.



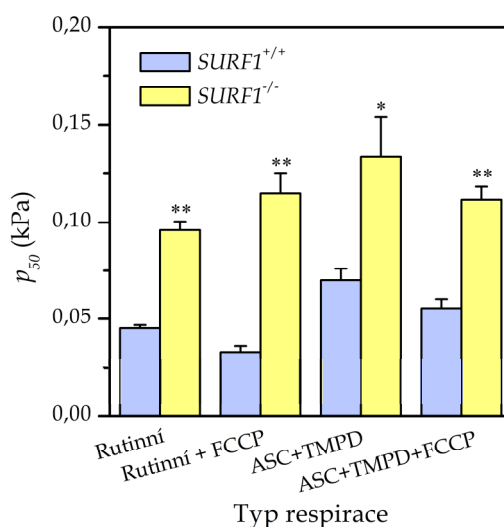
Obr. 4.12 Vliv defektu Surf1 proteinu na velikost membránového potenciálu.

Změny membránového potenciálu byly měřeny u 3 mg.mL⁻¹ buněk (A) kontrolních (*SURF1*^{+/+}) nebo (B) s defektem *Surf1* proteinu (*SURF1*^{-/-}) permeabilizovaných digitoninem 20 µg.mg proteinu⁻¹ (DIG) v přítomnosti 10 mM glutamátu (GLU), 2,5 mM malátu (MAL), 10 mM sukcinátu (SUC), 1 µg.mL⁻¹ antimycinu A (AA), 2 mM askorbátu (ASC), 0,6 mM TMPD a 1 µM FCCP. Z naměřených křivek byly počítány hodnoty potenciálu dosaženého COX s askorbátem + TMPD (pTPP_{AT}) a membránového potenciálu dosaženého při plné energizaci glutamátem, malátem a sukcinátem (pTPP_{GMS}) (C), které byly dány do poměru (D). Data představují průměr ± SE (*SURF1*^{+/+} *n* = 7, *SURF1*^{-/-} *n* = 5, ** *p* < 0,01).

4.2.4 Vliv defektu Surf1 na afinitu ke kyslíku

Hodnota p_{50} byla počítána pro čtyři různé typy respirace (Obr. 4.13) – rutinní (endogenní) respiraci intaktních buněk a respiraci buněk permeabilizovaných digitoninem s askorbátem + TMPD, a to v obou případech jak ve stavu spřaženém, tak rozpřaženém, jenž byl dosažen titrací FCCP. Ve všech případech bylo p_{50} u *SURF1*^{-/-} buněk alespoň dvakrát zvýšeno. Stejně jako platilo pro inhibici kyanidem, i u COX deficiencie způsobené defektem proteinu Surf1 se p_{50} jeví jako nejcitlivější funkční parametr COX, jelikož respirace nebyla ovlivněna vůbec a membránový potenciál pouze mírně.

Na buňkách bylo opět možné pozorovat nižší afinitu ke kyslíku při vyšší rychlosti toku elektronů dýchacím řetězcem, tedy u respirace s askorbátem + TMPD. Na izolovaných mitochondriích byl rozdíl v absolutní hodnotě p_{50} mezi respirací se sukcinátem a s askorbátem + TMPD přibližně čtyřicetinasobný, na buňkách mezi rutinní respirací a respirací permeabilizovaných buněk s askorbátem + TMPD ani ne dvojnásobný.



Obr. 4.13 Vliv defektu Surf1 proteinu na afinitu ke kyslíku.

Afinita ke kyslíku buněk kontrolních (*SURF1*^{+/+}) a s defektem (*SURF1*^{-/-}) byla hodnocena jako parametr p_{50} u čtyř typů respirace – na intaktních buňkách u rutinní (tj. v kultivačním médiu DMEM) a rutinní rozpřažené přidáním FCCP (u každého vzorku titrace o krocích 0,1 – 0,2 μ M až do dosažení maximální spotřeby kyslíku), na buňkách permeabilizovaných digitoninem (20 μ g.mg proteinu⁻¹, koncentrace stanovena titrací při prvním měření) se substráty COX askorbátem (2mM) + TMPD (0,6 mM, koncentrace stanovena titrací při prvním měření) u respirace spřažené (ASC+TMPD) i rozpřažené FCCP (ASC+TMPD+FCCP). Jednotlivé body představují průměr \pm SE ($n = 5 - 12$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

5 Diskuze

V posledním desetiletí byla popsána struktura savčího komplexu COX, stejně jako jeho biogeneze a asemblace, funkční kinetika a regulace (7, 10, 12, 15). Byla rovněž intenzivně studována role COX v patologických stavech, zvláště při mitochondriálních onemocněních způsobených defektní COX v důsledku mutací genů kódujících její podjednotky nebo asemblační faktory (94, 95).

Funkce COX může být ovlivněna řadou toxických látek pocházejících z prostředí, např. kyanidy, azidy, sulfidy, NO či CO, z nichž některé mohou fyziologicky fungovat jako signální molekuly (46). Nejvíce zkoumaným inhibitorem COX je kyanid (NaCN či KCN), protože představuje největší potenciální nebezpečí vzhledem k jeho masivnímu užívání v chemickém průmyslu. Oběti požárů jsou často přiotráveny kyanidem, jelikož při spalování polymerních látek dochází k uvolňování plynného kyanovodíku. Kyanidy se používají rovněž k extrakci zlata z rud a někdy může dojít i k úniku do přírody. V neposlední řadě existují obavy, že kyanid by mohl být zneužit jako chemická zbraň.

Mechanismus interakce KCN s COX není tak jednoduchý a jasný, jak bylo původně předpokládáno. Kupříkladu mezi kyanidem, NO a O₂ dochází k velmi komplikovaným interakcím (38, 96, 97). Známa je rovněž schopnost COX produkovat oxid dusnatý za hypoxických podmínek (98). Lepší znalost mechanismu inhibice COX je základem pro navržení účinné strategie, jak chránit COX proti toxickým látkám a jak obnovit aktivitu inhibované COX, pokud první způsob selže.

V rámci této diplomové práce byla analyzována kyanidová inhibice COX a také schopnost pyruvátu zvrátit inhibiční efekt KCN v mitochondriích izolovaných z jater potkana. Studovány byly tři funkční parametry COX, transport elektronů měřený jako spotřeba kyslíku, pumpování protonů přes vnitřní mitochondriální membránu stanovené jako mitochondriální membránový potenciál ($\Delta\psi_m$) a afinita ke kyslíku určená jako parametr p_{50} pro kyslík, za využití dvou modelových měření s různými substráty – sukcinátem a askorbátem + TMPD. Tato měření umožnila stanovit účinek KCN s ohledem na (i) funkci celého dýchacího řetězce a (ii) samotné COX, která je hlavním cílem toxického působení KCN.

Výsledky ukazují, že všechny tři zmíněné funkční parametry COX jsou negativně ovlivněny KCN. Afinita ke kyslíku vykazovala největší senzitivitu k přidanému KCN,

přičemž byla výrazně snížena již při mikromolárních koncentracích KCN, zatímco transport elektronů a $\Delta\psi_m$ byly za těchto podmínek mnohem slaběji inhibovány. Jedná se o velmi důležitý nález, neboť intracelulární a především intramitochondriální koncentrace kyslíku jsou fyziologicky velmi nízké, což bylo dokumentováno měřeními v mozku i dalších tkáních (16). Stanovení skutečného pO_2 a jeho gradientů v různých funkčních stavech mitochondrií je provázáno technickými problémy, přesto hodnoty pO_2 nižší než 1 kPa byly pozorovány ve tkáních (99, 100), a ještě nižší jsou očekávány v mitochondriích, kde je kyslík v aktivním stavu rychle spotřebováván (16, 101). V souvislosti s poklesem afinity ke kyslíku vyvolaným KCN (p_{50} 0,2 – 0,7 kPa při 2 – 5 μM KCN) (Obr. 4.8, 4.9) lze předpokládat, že otrava KCN je životu nebezpečná již při velmi nízkých koncentracích, kdy ještě není limitována rychlost respirace sníženou kapacitou COX.

Podle Gnaigra et al. (18) je mnohem vhodnějším parametrem tzv. katalytická účinnost (J_{max}/p_{50}) než p_{50} samo o sobě, jelikož buňky mohou kompenzovat velké snížení afinity ke kyslíku v aktivním stavu zvýšením J_{max} , takže J_{max}/p_{50} se příliš nemění. V prezentovaných měřeních však nízké koncentrace KCN ovlivnily tok elektronů pouze mírně, což znamená, že katalytická účinnost byla snížena podobně jako samotná afinita ke kyslíku ($1/p_{50}$). Vysoká senzitivita p_{50} k nízkým koncentracím KCN rovněž znamená, že by to byl nejlepší parametr ke stanovení účinků KCN a p_{50} by mohlo mít praktické využití pro detekci otravy kyanidem.

I když z porovnání jednotlivých parametrů $\Delta\psi_m$ vyšel jako nejméně poškozený, neznamená to nutně, že protontranslokační aktivita COX je méně citlivá vůči KCN než transport elektronů. Mitochondriální membránový potenciál je parametr, který zahrnuje jak pumpování protonů, tak nescifickou propustnost („leak“) mitochondriální membrány a je ovlivněn také řadou mitochondriálních transportérů a jejich ligandů. Závislost mezi $\Delta\psi_m$ a transportem protonů proto nemá lineární charakter (102).

Součástí experimentů bylo rovněž promývání mitochondrií, jež odstranilo prakticky veškerý KCN. Účinek KCN na všechny měřené parametry se touto procedurou ukázal jako plně reverzibilní, a dokonce i afinita ke kyslíku, reprezentovaná hodnotou p_{50} , byla zcela obnovena. Na rozdíl od promývání reaktivace COX přidáním pyruvátu nebyla zdaleka úplná, což bylo opět nejzřetelnější v případě p_{50} . Navzdory plné reverzibilitě účinku KCN nebyl pyruvát schopen zcela obnovit aktivitu COX, ačkoli byl aplikován ve více než 250-násobném nadbytku. Možné vysvětlení přináší pK_a HCN, které je poměrně vysoké, proto je v oblasti neutrálního pH ve své protonované formě, a jako elektroneutrální molekula se tedy může snadno vázat do binukleárního centra COX lokalizovaného uvnitř

hydrofobního jádra tohoto proteinového komplexu (46). Nicméně reakce kyanidu s pyruvátem vzhledem ke svému mechanismu vyžaduje vznik aniontu, aby mohlo dojít k nukleofilnímu ataku na karbonylový uhlík, proto tato reakce probíhá přednostně v basickém pH, kdy je kyanid přítomen především ve své deprotonované formě (61, 65, 73). Reakce pyruvátu s kyanidem v neutrálním médiu tedy není úplná a residuální KCN zodpovědný za přetrvávající pokles její aktivity musí být vázán na COX. Inhibiční konstanta K_i pro vazbu kyanidu na izolovanou COX byla stanovena jako 0,1 – 1,0 μM (103), což dobře koresponduje s naměřenými koncentracemi KCN v médiu po přidání pyruvátu.

Výsledky rovněž ukazují nižší citlivost všech měřených parametrů ke KCN, pokud byl jako substrát dýchacího řetězce použit sukcinát, ve srovnání s askorbátem + TMPD. A naopak, reaktivační účinek pyruvátu byl lepší za podmínek, kdy byla sledována aktivita celého dýchacího řetězce nežli aktivita samotné COX. Tato obecně nižší citlivost ke KCN, jež se projevuje u dýchacího řetězce jako celku na rozdíl od COX, je nejpravděpodobněji způsobena *thresholdem* COX. Dokumentována byla totiž nadbytečná kapacita COX ve srovnání s ostatními komplexy mitochondriálního dýchacího řetězce (18, 34, 35, 37, 39), což znamená, že snížená aktivita COX je stále dostatečná pro udržení vysoké rychlosti respirace se sukcinátem. Proto nadbytečná kapacita COX v mitochondriálním dýchacím řetězci může do určité míry kompenzovat pokles aktivity v důsledku toxického účinku KCN *in vivo*. Představuje tak přirozený způsob obrany nejdůležitější energetické dráhy savčích buněk proti jedům působícím na úrovni COX. Nicméně ani kombinace tohoto navrhovaného obranného mechanismu a účinku pyruvátu, jenž byl pozorován při jeho téměř 250-násobném nadbytku nad KCN, nestačí k obnovení původní rychlosti respirace ani velikosti membránového potenciálu, natož afinity ke kyslíku.

Přestože byl pozitivní efekt 2-oxokyselin na respiraci inhibovanou kyanidem popsán již v 50. letech (63, 65), *thresholdy* jsou dosud často měřeny s použitím pyruvátu a malátu jako substrátů (34, 35). Jako artefakt pak vzhledem k reakci kyanidu s pyruvátem mohou být pozorovány o něco vyšší rezervní kapacity COX, jelikož jsou pyruvátem eliminovány nízké koncentrace kyanidu. Dalším cílem by tedy mohlo být pokusit se ukázat předpokládané rozdíly v *thresholdu* COX se substráty pyruvát + malát a glutamát + malát, které jsou alternativně používány jako zdroj elektronů pro CoI.

Model myši s knockoutovaným genem *SURF1* (79) umožňuje porovnat funkční projevy defektu asemblačního faktoru Surf1 mezi buňkami pacientů a *SURF1*^{-/-} myši. Snížení funkční kapacity COX defektem proteinu Surf1 je analogické k zainhibování určité frakce COX nízkými koncentracemi kyanidu. V tomto případě by však trvale snížená

účinnost respirace mohla vést ke kompenzačním mechanismům, kdy by se buňka snažila zvýšenou expresí proteinů dýchacího řetězce posílit jeho funkci, jak bylo pozorováno na buňkách *Surf1*-deficientních pacientů (N. Kovářová, nepublikovaná data). Získané výsledky z WB (Obr. 4.10) však nepodporují tuto hypotézu, jelikož v množství komplexů dýchacího řetězce nebyly kromě COX, jejíž obsah byl snížen na 58 %, nalezeny žádné rozdíly. Navíc ani aktivita segmentu dýchacího řetězce „upstream“ od COX (SCCR) nebyla signifikantně zvýšena a dosahovala kontrolních hodnot (Tab. 4.1).

Nejen u COX deficiencí, ale i u dalších typů mitochondriálních defektů je opakovaně pozorována akumulace abnormálních mitochondrií (104). Absolutní hodnoty enzymové aktivity CS, jež je považována za mitochondriální marker, byly u *SURF1*^{-/-} buněk mírně sníženy (Tab. 4.1). Na druhou stranu signál protilátky proti PDH na WB byl mírně zvýšen. Některé zjištěné údaje proto indikují, že by se mohl měnit počet mitochondrií v *SURF1*^{-/-} buňkách. Odpověď na otázku, zda *SURF1*^{-/-} buňky obsahují změněné množství mitochondrií, by mohla poskytnout kvantifikace mitochondriální DNA pomocí RT-PCR, avšak ani tato metoda není stoprocentně spolehlivá.

Obsah a elektrontransportní aktivita COX měřená spektrofotometricky byly sníženy velmi podobně, a to na 58 % (jak při normalizaci na signál protilátky proti aktinu, tak PDH), resp. 54 % (na 62 % při normalizaci na aktivitu CS). Tento výrazný pokles obsahu a enzymatické aktivity COX se však neprojeví ani na endogenní respiraci v kultivačním médiu (DMEM), ani na respiraci permeabilizovaných buněk s askorbátem + TMPD, která přímo reflektuje vlastní aktivitu COX. Na rozdíl od spektrofotometricky měřené aktivity COX v buňkách solubilizovaných LM nedojde u respirace intaktních mitochondrií k limitaci její rychlosti omezenou elektrontransportní funkcí COX, což je situace analogická k buňkám *Surf1*-deficientních pacientů. U buněk pacientů byla totiž aktivita COX měřená spektrofotometricky snížena přibližně na 20 %, zatímco respirace s askorbátem + TMPD pouze na 50 - 70 %. Navíc byla ukázána citlivost respirace buněk *Surf1*-deficientních pacientů k laurylmaltosidu (LM), zatímco u kontrolních buněk došlo k očekávané aktivaci respirace. Na základě těchto poznatků byla formulována hypotéza, že v *SURF1*^{-/-} buňkách pacientů dochází ke snížení protontranslokační aktivity, ale k „upregulaci“ elektrontransportní aktivity COX, jež je citlivá k detergentu (LM). Proto se upregulace neprojeví při spektrofotometrickém měření aktivity, ale pouze při měření respirace. Nebylo ovšem jasné, zda se jedná o vlastnosti plně asemblovaného komplexu, či jeho výrazně nakumulovaných intermediátů (28).

COX funguje také jako protonová pumpa a její protontranslokační aktivita přispívá k vybudování mitochondriálního membránového potenciálu nutného pro mitochondriální produkci ATP. V absolutních hodnotách $\Delta\psi_m$ byly nalezeny rozdíly mezi buňkami kontrolními a Surf1-deficientními. Kontrolní buňky dosahovaly $pTPP_{GMS}$ o hodnotě $0,50 \pm 0,01$, zatímco u *SURF1*^{-/-} buněk byl tento parametr signifikantně snížen na $0,29 \pm 0,01$. Bez normalizace na objem mitochondrií, který se může mezi oběma typy buněk výrazně lišit, nelze však data hodnotit kvantitativně, nýbrž pouze relativně. Z uvedených výsledků lze jako mitochondriální marker využít signál PDH či porinu z WB (ale toto hodnocení je pouze semikvantitativní), nebo lépe aktivitu CS. Podíl $pTPP_{GMS}$ a aktivity CS v podstatě představuje membránový potenciál normalizovaný na objem mitochondrií. Přesto je toto porovnání zatíženo velkou nepřesností. Vzhledem k limitujícímu množství materiálu nebyla měřena aktivita CS na stejných vzorcích jako membránový potenciál, proto data nemohla být statisticky vyhodnocena. Na podílu průměrných hodnot je však zřetelná tendence k nižšímu membránovému potenciálu u *SURF1*^{-/-} buněk. Poměr $pTPP_{GMS}$ /aktivita CS byl u kontrolních buněk číselně roven 0,015, kdežto u *SURF1*^{-/-} buněk pouze 0,010. Z těchto údajů plyne, že *SURF1*^{-/-} buňky nejsou v respiračním stavu 4 schopné vybudovat stejný mitochondriální membránový potenciál jako buňky kontrolní.

Relativní vyhodnocení membránového potenciálu, tedy poměr $pTPP_{AT}/pTPP_{GMS}$, ukazuje, že COX *SURF1*^{-/-} buněk ($pTPP_{AT}/pTPP_{GMS} = 0,73$) není schopna vybudovat membránový potenciál na takovou úroveň jako COX buněk kontrolních ($pTPP_{AT}/pTPP_{GMS} = 0,92$). Tím je potvrzeno, že protontranslokační aktivita COX ze Surf1-deficientních myších buněk je narušena stejně jako u buněk pacientů, u nichž byl membránový potenciál mnohem citlivější k rozpřahovači FCCP než u buněk kontrolních (28).

Na buňkách Surf1-deficientních pacientů byla již dříve prokázána snížená afinita ke kyslíku (p_{50} endogenní respirace spřažených buněk bylo zvýšeno 2,1krát) (33). Také na myších fibroblastech bylo ve všech případech p_{50} u *SURF1*^{-/-} buněk alespoň dvakrát zvýšeno. Podobně byla normální normoxická respirace provázená sníženou afinitou ke kyslíku demonstrována i u COX deficiencí způsobených defekty v jejích jaderně kódovaných podjednotkách, konkrétně u buněk s podjednotkami Cox5a a Cox6aL knockdownovanými prostřednictvím siRNA (22). COX v normoxii může tedy fungovat celkem normálně, ale v hypoxických podmínkách, které se vyskytují ve tkáních, by se k limitaci produkce ATP nižší protontranslokační aktivitou COX přidala navíc ještě limitace v důsledku nižšího toku elektronů. U pacientů to vede k patologickému projevu především v mozku, kde jsou

koncentrace kyslíku kvůli difúzi na dlouhou vzdálenost z krevního řečiště opravdu nízké, u myši defekt patrně nedosahuje prahové hodnoty, protože se fenotypicky jeví normální (79).

Výpočet p_{50} se substráty askorbát + TMPD ztěžuje jejich autooxidace, proto by bylo dobré zjistit, zda není možné jako substrát využít redukovaný cyt *c*. Problémem by mohlo být, že by oxidovaný cyt *c*, který by se postupně nahromadil, mohl zpětně alostericky inhibovat aktivitu COX. Vzhledem k vysoké spotřebě cyt *c* by tento způsob výpočtu p_{50} byl velmi nákladný.

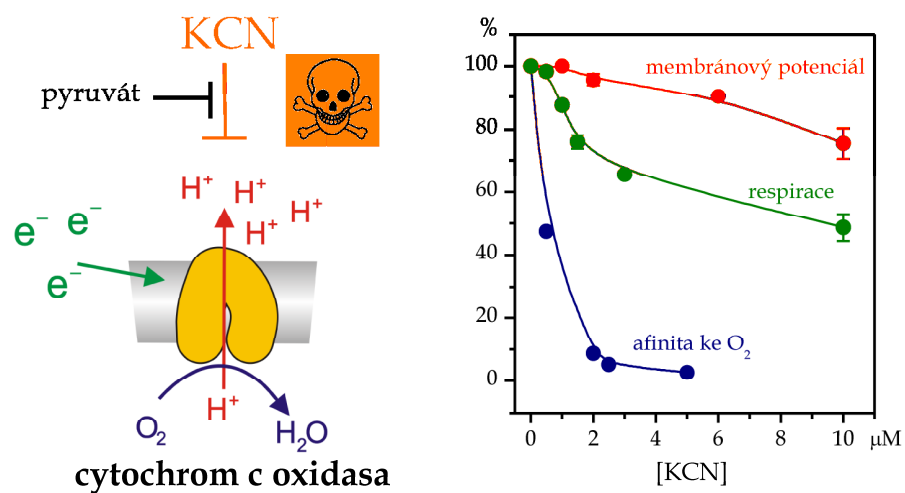
Ze souhrnného porovnání výsledků z experimentů provedených na fibroblastech pacientů s defektem assemblyního faktoru Surf1 (28, 33) a na myších fibroblastech se *SURF1* knockoutem (79) prezentovaných v této práci vyplývá, že u lidských buněk jsou projevy defektu proteinu Surf1 u většiny studovaných parametrů mnohem vážnější. Jako příklad lze uvést 80% snížení aktivity COX měřené spektrofotometricky na buňkách pacientů, zatímco u myších fibroblastů byla aktivita COX snížena pouze o 46 %. U pacientů rovněž dochází k hromadění assemblyních intermediátů, které zřejmě nejsou přítomny v myších buňkách v takové míře (93). Zdá se tedy, že protein Surf1 na rozdíl od člověka u myši není natolik esenciální.

V buňkách pacientů s poškozeným proteinem Surf1 se většina COX nachází ve formě intermediátů, zatímco v myších *SURF1*^{-/-} buňkách byl nalezen převážně holoenzym (93). Lze proto navrhnout hypotézu, že změna funkčních projevů COX u Surf1 defektu je patrně způsobena modifikací plně assemblyvaného komplexu a nejedná se o vlastnost přítomných assemblyních intermediátů. Další zkoumání na myším modelu by mělo vést k detailnímu objasnění strukturně-funkčních změn COX.

Jedním z cílů mé diplomové práce bylo pokusit se alespoň zjednodušeně porovnat vliv exogenního (KCN) a endogenního činitele (defekt Surf1 proteinu) na jednotlivé sledované funkční parametry COX. Ukazuje se, že ačkoli je snížena funkční kapacita COX, buď inhibicí kyanidem, nebo vlivem defektu assemblyního faktoru, rychlost respirace není výrazně ovlivněna. V obou případech však platí, že p_{50} je ke snížení kapacity COX zdaleka nejcitlivější, a tudíž je nejspolehlivějším faktorem detekujícím poškození COX.

6 Shrnutí

- Kyanid inhibuje cytochrom *c* oxidasu (COX), přičemž nejcitlivějším funkčním parametrem COX je afinita ke kyslíku ($1/p_{50}$).
- Inhibice COX kyanidem je plně reverzibilní po promytí mitochondrií, pyruvát však není schopný žádný z funkčních parametrů (respiraci, mitochondriální membránový potenciál ani afinitu ke kyslíku) obnovit k původní aktivitě.



- Defekt asemblačního faktoru Surf1 má v myších fibroblastech za následek snížený obsah a aktivitu COX, přičemž afinita ke kyslíku se ukázala opět jako funkční parametr COX, který je nejcitlivější k poškození.
- Na základě porovnání funkčních projevů Surf1 defektu na buňkách pacientů a myšího knockoutu se zdá, že Surf1 nehraje u myši tak esenciální roli jako u člověka, protože myší *SURF1*^{-/-} buňky vykazovaly menší poškození mitochondriálních funkcí.

7 Seznam použité literatury

- (1) Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- (2) Frey, T. G., Renken, C. W. and Perkins, G. A. (2002) Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta* 1555, 196-203.
- (3) Schagger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1555, 154-159.
- (4) Voet, D., Voet, J. G. (2004) Electron transport and oxidative phosphorylation, In *Biochemistry*, John Wiley and sons, Inc., USA.
- (5) Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- (6) Nicholls, D. G., Ferguson, S. J. (2002) *Bioenergetics* 3, Academic Press, UK.
- (7) Brzezinski, P. and Gennis, R. B. (2008) Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries. *J Bioenerg Biomembr* 40, 521-531.
- (8) Abramson, J., Svensson-Ek, M., Byrne, B. and Iwata, S. (2001) Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1544, 1-9.
- (9) Poyton, R. O. and McEwen, J. E. (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* 65, 563-607.
- (10) Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Huttemann, M., Lee, I. and Kadenbach, B. (2001) Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *Chembiochem* 2, 392-403.
- (11) Kadenbach, B., Huttemann, M., Arnold, S., Lee, I. and Bender, E. (2000) Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med* 29, 211-221.
- (12) Stiburek, L., Hansikova, H., Tesarova, M., Cerna, L. and Zeman, J. (2006) Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res* 55 Suppl 2, S27-41.
- (13) Capaldi, R. A. (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 59, 569-596.
- (14) Kadenbach, B., Kuhn-Nentwig, L. and Büge, U. (1987) Evolution of a Regulatory Enzyme: Cytochrome-c Oxidase (Complex IV). *Current topics in bioenergetics* 15, 113 - 161.
- (15) Hosler, J. P., Ferguson-Miller, S. and Mills, D. A. (2006) Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu Rev Biochem* 75, 165-187.
- (16) Erecinska, M. and Silver, I. A. (2001) Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 128, 263-276.
- (17) Gnaiger, E. (2001) Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol* 128, 277-297.
- (18) Gnaiger, E., Lassnig, B., Kuznetsov, A., Rieger, G. and Margreiter, R. (1998) Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* 201, 1129-1139.
- (19) Scandurra, F. M. and Gnaiger, E. Cell respiration under hypoxia: facts and artefacts in mitochondrial oxygen kinetics. *Adv Exp Med Biol* 662, 7-25.
- (20) Steinlechner-Maran, R., Eberl, T., Kunc, M., Margreiter, R. and Gnaiger, E. (1996) Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells. *Am J Physiol* 271, C2053-2061.

- (21) Gnaiger, E., Lassnig, B., Kuznetsov, A. V. and Margreiter, R. (1998) Mitochondrial respiration in the low oxygen environment of the cell. Effect of ADP on oxygen kinetics. *Biochim Biophys Acta* 1365, 249-254.
- (22) Fornuskova, D., Stiburek, L., Wenchich, L., Vinsova, K., Hansikova, H. and Zeman, J. (2010) Novel insights into the assembly and function of human nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits 4, 5a, 6a, 7a and 7b. *Biochem J.* doi:10.1042/BJ20091714
- (23) Huxley, C. and Fried, M. (1990) The mouse surfeit locus contains a cluster of six genes associated with four CpG-rich islands in 32 kilobases of genomic DNA. *Mol Cell Biol* 10, 605-614.
- (24) Duhig, T., Ruhrberg, C., Mor, O. and Fried, M. (1998) The human Surfeit locus. *Genomics* 52, 72-78.
- (25) Mashkevich, G., Repetto, B., Glerum, D. M., Jin, C. and Tzagoloff, A. (1997) SHY1, the yeast homolog of the mammalian SURF-1 gene, encodes a mitochondrial protein required for respiration. *J Biol Chem* 272, 14356-14364.
- (26) Tiranti, V., Galimberti, C., Nijtmans, L., Bovolenta, S., Perini, M. P. and Zeviani, M. (1999) Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions. *Hum Mol Genet* 8, 2533-2540.
- (27) Nijtmans, L. G., Artal Sanz, M., Bucko, M., Farhoud, M. H., Feenstra, M., Hakkaart, G. A., Zeviani, M. and Grivell, L. A. (2001) Shy1p occurs in a high molecular weight complex and is required for efficient assembly of cytochrome c oxidase in yeast. *FEBS Lett* 498, 46-51.
- (28) Pecina, P., Capkova, M., Chowdhury, S. K., Drahota, Z., Dubot, A., Vojtiskova, A., Hansikova, H., Houst'kova, H., Zeman, J., Godinot, C. and Houstek, J. (2003) Functional alteration of cytochrome c oxidase by SURF1 mutations in Leigh syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1639, 53-63.
- (29) Williams, S. L., Valnot, I., Rustin, P. and Taanman, J. W. (2004) Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J Biol Chem* 279, 7462-7469.
- (30) Stiburek, L., Vesela, K., Hansikova, H., Pecina, P., Tesarova, M., Cerna, L., Houstek, J. and Zeman, J. (2005) Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. *Biochem J* 392, 625-632.
- (31) Stiburek, L., Vesela, K., Hansikova, H., Hulkova, H. and Zeman, J. (2009) Loss of function of Sco1 and its interaction with cytochrome c oxidase. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C1218-1226.
- (32) Bundschuh, F. A., Hannappel, A., Anderka, O. and Ludwig, B. (2009) Surf1, associated with Leigh syndrome in humans, is a heme-binding protein in bacterial oxidase biogenesis. *J Biol Chem* 284, 25735-25741.
- (33) Pecina, P., Gnaiger, E., Zeman, J., Pronicka, E. and Houstek, J. (2004) Decreased affinity for oxygen of cytochrome-c oxidase in Leigh syndrome caused by SURF1 mutations. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1384-1388.
- (34) Rossignol, R., Malgat, M., Mazat, J. P. and Letellier, T. (1999) Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. *J Biol Chem* 274, 33426-33432.
- (35) Rossignol, R., Letellier, T., Malgat, M., Rocher, C. and Mazat, J. P. (2000) Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J* 347 Pt 1, 45-53.
- (36) Mazat, J. P., Rossignol, R., Malgat, M., Rocher, C., Faustin, B. and Letellier, T. (2001) What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions...that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects. *Biochim Biophys Acta* 1504, 20-30.

- (37) Piccoli, C., Scrima, R., Boffoli, D. and Capitanio, N. (2006) Control by cytochrome c oxidase of the cellular oxidative phosphorylation system depends on the mitochondrial energy state. *Biochem J* 396, 573-583.
- (38) Leavesley, H. B., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J. L. and Isom, G. E. (2008) Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicol Sci* 101, 101-111.
- (39) Dalmonte, M. E., Forte, E., Genova, M. L., Giuffre, A., Sarti, P. and Lenaz, G. (2009) Control of respiration by cytochrome c oxidase in intact cells: role of the membrane potential. *J Biol Chem* 284, 32331-32335.
- (40) Moreno-Sanchez, R., Saavedra, E., Rodriguez-Enriquez, S. and Olin-Sandoval, V. (2008) Metabolic control analysis: a tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *J Biomed Biotechnol* 2008, 597913.
- (41) Villani, G. and Attardi, G. (1997) In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1166-1171.
- (42) Villani, G., Greco, M., Papa, S. and Attardi, G. (1998) Low reserve of cytochrome c oxidase capacity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types. *J Biol Chem* 273, 31829-31836.
- (43) Giuffre, A., Sarti, P., D'Itri, E., Buse, G., Soulimane, T. and Brunori, M. (1996) On the mechanism of inhibition of cytochrome c oxidase by nitric oxide. *J Biol Chem* 271, 33404-33408.
- (44) Brunori, M., Forte, E., Arese, M., Mastronicola, D., Giuffre, A. and Sarti, P. (2006) Nitric oxide and the respiratory enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1757, 1144-1154.
- (45) Petersen, L. C. (1977) The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 460, 299-307.
- (46) Cooper, C. E. and Brown, G. C. (2008) The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr* 40, 533-539.
- (47) Wagner, F., Asfar, P., Calzia, E., Radermacher, P. and Szabo, C. (2009) Bench-to-bedside review: Hydrogen sulfide--the third gaseous transmitter: applications for critical care. *Crit Care* 13, 213.
- (48) Chen, Y. R., Sturgeon, B. E., Gunther, M. R. and Mason, R. P. (1999) Electron spin resonance investigation of the cyanide and azidyl radical formation by cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 274, 24611-24616.
- (49) Skrede, S., Bremer, J. and Eldjarn, L. (1965) The Effect of Disulphides on Mitochondrial Oxidations. *Biochem J* 95, 838-846.
- (50) Drahota, Z., Vrbacky, M., Rauchova, H. and Kalous, M. (1996) Inhibition of mitochondrial cytochrome C oxidase by dicarbanonaborates. *Biochem Mol Biol Int* 39, 1267-1273.
- (51) van Buuren, K. J., Nicholis, P. and van Gelder, B. F. (1972) Biochemical and biophysical studies on cytochrome aa 3 . VI. Reaction of cyanide with oxidized and reduced enzyme. *Biochim Biophys Acta* 256, 258-276.
- (52) Jones, M. G., Bickar, D., Wilson, M. T., Brunori, M., Colosimo, A. and Sarti, P. (1984) A re-examination of the reactions of cyanide with cytochrome c oxidase. *Biochem J* 220, 57-66.
- (53) Wilson, M. T., Antonini, G., Malatesta, F., Sarti, P. and Brunori, M. (1994) Probing the oxygen binding site of cytochrome c oxidase by cyanide. *J Biol Chem* 269, 24114-24119.
- (54) Palmer, G. (1993) Current issues in the chemistry of cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* 25, 145-151.

- (55) Clark, J. F., Matsumoto, T. and Nakayama, S. (2000) Intact smooth muscle metabolism: its responses to cyanide poisoning and pyruvate stimulation. *Front Biosci* 5, A18-23.
- (56) Cummings, T. F. (2004) The treatment of cyanide poisoning. *Occup Med (Lond)* 54, 82-85.
- (57) Beasley, D. M. and Glass, W. I. (1998) Cyanide poisoning: pathophysiology and treatment recommendations. *Occup Med (Lond)* 48, 427-431.
- (58) Broderick, K. E., Potluri, P., Zhuang, S., Scheffler, I. E., Sharma, V. S., Pilz, R. B. and Boss, G. R. (2006) Cyanide detoxification by the cobalamin precursor cobinamide. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 641-649.
- (59) Labianca, D. A. (1979) On the Nature of Cyanide Poisoning. *J. Chem. Educ.* 56, 788 - 791.
- (60) Nagasawa, H. T., Goon, D. J., Crankshaw, D. L., Vince, R. and Patterson, S. E. (2007) Novel, orally effective cyanide antidotes. *J Med Chem* 50, 6462-6464.
- (61) McMurry, J. (2000) *Organic Chemistry*, 5 ed., Brooks/Cole, Pacific Grove, CA, USA.
- (62) Niknahad, H., Khan, S., Sood, C. and O'Brien, P. J. (1994) Prevention of cyanide-induced cytotoxicity by nutrients in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 128, 271-279.
- (63) Slater, E. C. (1955) Phosphorylation coupled with the oxidation of alpha-ketoglutarate by heart-muscle sarcosomes. 3. Experiments with ferricytochrome c as hydrogen acceptor. *Biochem J* 59, 392-405.
- (64) Slater, E. C. (1967) Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation. *Methods Enzymol* 10, 48 - 57.
- (65) Nosek, J., Chmelar, V. and Ledvina, M. (1957) [Antide in cyanide poisoning; effect of ascorbic acid, ferronate C, glucose, dioxycetone and pyrrolic acid on the course of experimental poisoning.]. *Cesk Fysiol* 6, 87-94.
- (66) Schwartz, C., Morgan, R. L., Way, L. M. and Way, J. L. (1979) Antagonism of cyanide intoxication with sodium pyruvate. *Toxicol Appl Pharmacol* 50, 437-441.
- (67) Moore, S. J., Norris, J. C., Ho, I. K. and Hume, A. S. (1986) The efficacy of alpha-ketoglutaric acid in the antagonism of cyanide intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol* 82, 40-44.
- (68) Bhattacharya, R., Kumar, D., Sugendran, K., Pant, S. C., Tulsawani, R. K. and Vijayaraghavan, R. (2001) Acute toxicity studies of alpha-ketoglutarate: a promising antidote for cyanide poisoning. *J Appl Toxicol* 21, 495-499.
- (69) Bhattacharya, R. and Vijayaraghavan, R. (2002) Promising role of alpha-ketoglutarate in protecting against the lethal effects of cyanide. *Hum Exp Toxicol* 21, 297-303.
- (70) Tulsawani, R. K., Debnath, M., Pant, S. C., Kumar, O., Prakash, A. O., Vijayaraghavan, R. and Bhattacharya, R. (2005) Effect of sub-acute oral cyanide administration in rats: protective efficacy of alpha-ketoglutarate and sodium thiosulfate. *Chem Biol Interact* 156, 1-12.
- (71) Tulsawani, R., Kumar, D. and Bhattacharya, R. (2007) Effect of pre-treatment of alpha-ketoglutarate on cyanide-induced toxicity and alterations in various physiological variables in rodents. *Biomed Environ Sci* 20, 56-63.
- (72) Hariharakrishnan, J., Anand, T., Satpute, R. M., Jayaraj, R., Prasad, G. B. and Bhattacharya, R. (2009) Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes in different organs of rats after subacute cyanide exposure: effect of alpha-ketoglutarate. *Drug Chem Toxicol* 32, 268-276.
- (73) Breitmaier, E. and Jung, G. (2009) *Organische Chemie*, 6., revised ed., Thieme, Stuttgart.
- (74) Niknahad, H. and O'Brien, P. J. (1996) Antidotal effect of dihydroxyacetone against cyanide toxicity in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 138, 186-191.

- (75) Hariharakrishnan, J., Satpute, R. M., Prasad, G. B. and Bhattacharya, R. (2009) Oxidative stress mediated cytotoxicity of cyanide in LLC-MK2 cells and its attenuation by alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine. *Toxicol Lett* 185, 132-141.
- (76) Delhumeau, G., Cruz-Mendoza, A. M. and Gomez Lojero, C. (1994) Protection of cytochrome c oxidase against cyanide inhibition by pyruvate and alpha-ketoglutarate: effect of aeration in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 126, 345-351.
- (77) Niknahad, H. and Ghelichkhani, E. (2002) Antagonism of cyanide poisoning by dihydroxyacetone. *Toxicol Lett* 132, 95-100.
- (78) Bustamante, E., Soper, J. W. and Pedersen, P. L. (1977) A high-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria. *Anal Biochem* 80, 401-408.
- (79) Dell'agnello, C., Leo, S., Agostino, A., Szabadkai, G., Tiveron, C., Zulian, A., Prella, A., Roubertoux, P., Rizzuto, R. and Zeviani, M. (2007) Increased longevity and refractoriness to Ca(2+)-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Hum Mol Genet* 16, 431-444.
- (80) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- (81) Lanza, I. R. and Nair, K. S. (2009) Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. *Methods Enzymol* 457, 349-372.
- (82) Labajova, A., Vojtiskova, A., Krivakova, P., Kofranek, J., Drahota, Z. and Houstek, J. (2006) Evaluation of mitochondrial membrane potential using a computerized device with a tetraphenylphosphonium-selective electrode. *Anal Biochem* 353, 37-42.
- (83) Nicholls, D. G. (1974) The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur J Biochem* 50, 305-315.
- (84) Zolkiewska, A., Zablocka, B., Duszyński, J. and Wojtczak, L. (1989) Resting state respiration of mitochondria: reappraisal of the role of passive ion fluxes. *Arch Biochem Biophys* 275, 580-590.
- (85) Nicholls, D. G. and Lindberg, O. (1972) Inhibited respiration and ATPase activity of rat liver mitochondria under conditions of matrix condensation. *FEBS Lett* 25, 61-64.
- (86) Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- (87) Yeung, Y. G. and Stanley, E. R. (2009) A solution for stripping antibodies from polyvinylidene fluoride immunoblots for multiple reprobings. *Anal Biochem* 389, 89-91.
- (88) Afkhami, A., Sarlak, N. and Zarei, A. R. (2007) Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of cyanide and thiocyanate using the partial least squares (PLS) regression. *Talanta* 71, 893-899.
- (89) Groen, A. K., Wanders, R. J., Westerhoff, H. V., van der Meer, R. and Tager, J. M. (1982) Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 257, 2754-2757.
- (90) Tager, J. M., Wanders, R. J., Groen, A. K., Kunz, W., Bohnensack, R., Kuster, U., Letko, G., Bohme, G., Duszyński, J. and Wojtczak, L. (1983) Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett* 151, 1-9.
- (91) Kunz, W., Gellerich, F. N., Schild, L. and Schonfeld, P. (1988) Kinetic limitations in the overall reaction of mitochondrial oxidative phosphorylation accounting for flux-dependent changes in the apparent $\Delta G_{\text{oxP}}/\Delta \mu_{\text{H}^+}$ ratio. *FEBS Lett* 233, 17-21.
- (92) Kondrashova, M., Zakharchenko, M. and Khunderyakova, N. (2009) Preservation of the in vivo state of mitochondrial network for ex vivo physiological study of mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2036-2050.

- (93) Kovářová, N. (2008) Charakterizace respiračních superkomplexů v různých typech savčích mitochondrií., Univerzita Karlova, Praha.
- (94) Shoubridge, E. A. (2001) Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* 106, 46-52.
- (95) Pecina, P., Houstkova, H., Hansikova, H., Zeman, J. and Houstek, J. (2004) Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res* 53 Suppl 1, S213-223.
- (96) Pearce, L. L., Bominaar, E. L., Hill, B. C. and Peterson, J. (2003) Reversal of cyanide inhibition of cytochrome c oxidase by the auxiliary substrate nitric oxide: an endogenous antidote to cyanide poisoning? *J Biol Chem* 278, 52139-52145.
- (97) Pearce, L. L., Lopez Manzano, E., Martinez-Bosch, S. and Peterson, J. (2008) Antagonism of nitric oxide toward the inhibition of cytochrome c oxidase by carbon monoxide and cyanide. *Chem Res Toxicol* 21, 2073-2081.
- (98) Castello, P. R., David, P. S., McClure, T., Crook, Z. and Poyton, R. O. (2006) Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab* 3, 277-287.
- (99) Cater, D. B., Garatini, S., Marina, F., Silver, I. A. (1961) Changes of oxygen tension in brain and somatic tissues induced by vasodilator and vasoconstrictor substances. *Proc. Roy Soc. Lond. B Biol. Sci* 155, 136-157.
- (100) Nair, P., Whalen, W. J. and Buerk, D. (1975) PO₂ of cat cerebral cortex: response to breathing N₂ and 100 per cent O₂. *Microvasc Res* 9, 158-165.
- (101) Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B. (1985) Oxygen pressure gradients in isolated cardiac myocytes. *J Biol Chem* 260, 6548-6554.
- (102) Nicholls, D. G. (1977) The effective proton conductance of the inner membrane of mitochondria from brown adipose tissue. Dependency on proton electrochemical potential gradient. *Eur J Biochem* 77, 349-356.
- (103) Nicholls, P., van Buuren, K. J. and van Gelder, B. F. (1972) Biochemical and biophysical studies on cytochrome aa₃. 8. Effect of cyanide on the catalytic activity. *Biochim Biophys Acta* 275, 279-287.
- (104) Shoubridge, E. A. (1994) Mitochondrial DNA diseases: histological and cellular studies. *J Bioenerg Biomembr* 26, 301-310.